

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CARDIO NEFRO TORACICHE

Ciclo XXXI

Settore Concorsuale di afferenza: 06/E2

Settore Scientifico disciplinare: MED/14

CARATTERIZZAZIONE DI GENOMI VIRALI MEDIANTE SPETTROMETRIA
DI MASSA MALDI-TOF IN NANOVESICOLE SIERICHE E URINARIE
ISOLATE DA PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO RENALE

Presentata da: Dott.ssa Carlotta Pia Cristalli

Coordinatore Dottorato

Prof. Gaetano Domenico Gargiulo

Supervisore

Prof. Gaetano La Manna

Co-Supervisore

Prof. Massimiliano Bonafè

Esame finale anno 2019

A Edoardo,

il mio "progetto di ricerca" prediletto

A Arduino,

colui che rende tutto possibile

A Noi,

all'ordinaria straordinarietà del Nostro essere Famiglia.

Indice

1. INTRODUZIONE	1
1.1. TRAPIANTO DI RENE	1
1.1.1. TIPOLOGIE DI TRAPIANTO RENALE	1
1.1.2. RISCHIO INFETTIVO NEL PAZIENTE TRAPIANTATO	4
1.2. I POLYOMAVIRUS	5
1.2.1. STRUTTURA DEL GENOMA DEI PYVS	7
1.2.2. SV12	9
1.3. I PAPILOMAVIRUS	9
1.3.1. STRUTTURA DEL GENOMA DEGLI HPVS	10
1.4. GLI ESOSOMI	12
1.5. BIOGENESI DEGLI ESOSOMI	13
1.6. CONTENUTO DEGLI ESOSOMI	14
1.6.1. PROTEINE	15
1.6.2. ACIDI NUCLEICI	15
1.6.3. LIPIDI	16
1.7. LE FUNZIONI DEGLI ESOSOMI	16
1.8. POTENZIALE UTILIZZO DEGLI ESOSOMI COME BIOMARKERS E AGENTI TERAPEUTICI	18
1.8.1. PROTEINE ESOSOMIALI: BIOMARCATORI DI INSORGENZA E PROGRESSIONE DI PATOLOGIE	18
1.8.2. RNA ESOSOMIALI: POTENZIALI BIOMARCATORI DI INSORGENZA E PROGRESSIONE DI PATOLOGIE	19
1.8.3. ESOSOMI COME AGENTI TERAPEUTICI	20
1.9. L'ISOLAMENTO DEGLI ESOSOMI	21
1.9.1. CENTRIFUGAZIONE DIFFERENZIALE E CENTRIFUGAZIONE SU GRADIENTE DI DENSITÀ	21
1.9.2. FILTRAZIONE	22
1.9.3. LA SEPARAZIONE IMMUNOMAGNETICA	22
1.9.4. L'ISOLAMENTO DEGLI ESOSOMI MEDIANTE KIT COMMERCIALI	23
1.10. LE SFIDE DELL'ANALISI ESOSOMIALE E LE POSSIBILI SOLUZIONI	24
1.10.1. SFIDE TECNICHE	24
1.10.2. SFIDE BIOLOGICHE	25
1.11. BIOMARCATORI DI MALATTIE RENALI NEGLI ESOSOMI	25
2. SCOPO DEL LAVORO	27
3. MATERIALI E METODI	28
3.1. DESCRIZIONE DELLA CASISTICA	28
3.2. ISOLAMENTO DEGLI ESOSOMI DA CAMPIONI DI SIERO	28
3.3. ISOLAMENTO DEGLI ESOSOMI DA CAMPIONI DI URINE	29
3.4. NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS	30
3.5. MACSPLEX EXOSOME ISOLATION KIT	31
3.6. TRATTAMENTO CON LA DNASI	33
3.7. ESTRAZIONE E NORMALIZZAZIONE DEL DNA VIRALE	34
3.8. ALLESTIMENTO DELLE PIASTRE DA LAVORO	35
3.9. GENOTYPING MEDIANTE MALDI TOF	36
3.9.1. SELEZIONE DEI VIRUS CANDIDATI, DISEGNO DEI PRIMERS E "DUMMY ALLELE"	36
3.9.2. ALLESTIMENTO DELLA PCR NELLA PIASTRA 384-WELL	39
3.9.3. AGGIUNTA DELLA SOLUZIONE DI PURIFICAZIONE SAP	40
3.9.4. ALLESTIMENTO DELL'IPLEX	41
3.9.5. TRATTAMENTO CON RESINA	43
3.9.6. NANODISPENSING	43
3.9.7. ANALISI MS-MALDI TOF	45

3.10.	SEPARAZIONE IMMUNOMAGNETICA	47
4.	RISULTATI.....	48
4.1.	ANALISI DELLA CASISTICA	48
4.2.	CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOVESCICOLE	50
4.2.1.	NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA).....	50
4.2.2.	MACSPLEX EXOSOME KIT	53
4.3.	ESITI DELLA DETERMINAZIONE DEI GENOMI VIRALI	57
4.4.	IL VIROMA DEI DONATORI MEDIANTE MALDI- TOF	58
4.5.	I PYVS NEI PAZIENTI TRAPIANTATI	60
4.5.1.	LA CINETICA DELLE INFEZIONI DA PYVS	60
4.6.	SEPARAZIONE IMMUNOMAGNETICA	62
4.7.	IL GENOMA VIRALE DEL JCV.....	65
4.8.	IL GENOMA VIRALE DELL'SV12.....	66
4.9.	GLI HPV MUCOSALI NEI TRAPIANTATI.....	67
4.9.1.	LA CINETICA INFETTIVA DEGLI HPV	67
5.	DISCUSSIONE.....	70
6.	CONCLUSIONI.....	74
7.	BIBLIOGRAFIA	75

Indice delle Abbreviazioni

ESKD: End Stage Kidney disease

CAKUT: Congenital Anormalities of the Kidneys and of the Urinary Tract)

CMV: Citomegalovirus

HLA: Human Leucocyte Antigen

PJP: Polmonite da pneumocystis carinii

MDR: Multiple Drug Resistance

CRE: Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi

PyVs: Poliomavirus

HPV: Human Papilloma Virus

LCR: Long Coding Region

EVs: Extracellular Vesicles

MVB: Multivescicular Bodies

ncRNA: non coding RNA

MHC: Major Histocompatibility Complex

NSCLC: carcinoma polmonare non a piccole cellule

GVHD: Graft versus Host Disease

PCR: Polymerase Chain Reaction

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight

NTA: Nanoparticle Tracking Analysis

SNP: Single Nucleotide Polimorphism

SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase

NV: Nanovesicole

PEG: Polietilenglicole

1. Introduzione

1.1. Trapianto di rene

Il trapianto renale rappresenta oggi la terapia sostitutiva d'elezione per la maggior parte dei pazienti affetti da insufficienza renale cronica in fase terminale (ESKD, End Stage Kidney disease), garantendo una migliore qualità della vita, minori costi sanitari rispetto al trattamento dialitico e una migliore sopravvivenza in tutti i pazienti compresi quelli di età più avanzata [1]. D'altro lato, nonostante i notevoli progressi terapeutici ottenuti nel rallentare la progressione del danno renale cronico, la malattia renale cronica ha acquisito caratteristiche epidemiche [2]. L'elevata incidenza di diabete mellito ed ipertensione, la costante crescita del numero di pazienti obesi ed il progressivo invecchiamento della popolazione generale sono le principali cause di diffusione epidemica della malattia negli adulti. In età pediatrica, i disordini congeniti fra cui la congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) invece, sono fra le cause più frequenti di insufficienza renale nei bambini, seguite dalle glomerulo nefriti [142]. Dal confronto tra la sopravvivenza dei pazienti affetti da insufficienza renale cronica di età superiore a 70 anni sottoposti a trapianto renale e quella dei coetanei in lista d'attesa, emerge che il rischio di mortalità dei pazienti trapiantati è del 41% inferiore rispetto a quello dei soggetti in lista [3]. In tal modo, negli ultimi anni, se da una parte gli eccellenti risultati ottenuti in campo trapiantologico hanno trasformato "il mito del trapianto" in una procedura di routine, dall'altra l'aumento progressivo del numero di pazienti affetti da insufficienza renale terminale ha portato ad un numero sempre crescente di richieste di iscrizione nelle liste di attesa per trapianto di rene. Questo contesto ha rapidamente generato una drammatica discrepanza tra domanda e disponibilità di reni da trapiantare. La differenza tra domanda ed offerta di organi per trapianto renale, oltre a determinare un allungamento dei tempi d'attesa medi, ha determinato un aumento del tasso di mortalità tra i potenziali riceventi iscritti in lista in attesa di trapianto di rene [4].

1.1.1. Tipologie di trapianto renale

Ad oggi due sono le tipologie di trapianto disponibili: il trapianto da donatore vivente e il trapianto da donatore deceduto (Figura 1). Il primo presenta dei vantaggi innegabili che sono legati, per lo più, alla programmabilità dell'intervento e a un minor rischio di rigetto in presenza di donatori consanguinei (previa verifica della compatibilità immunologica).

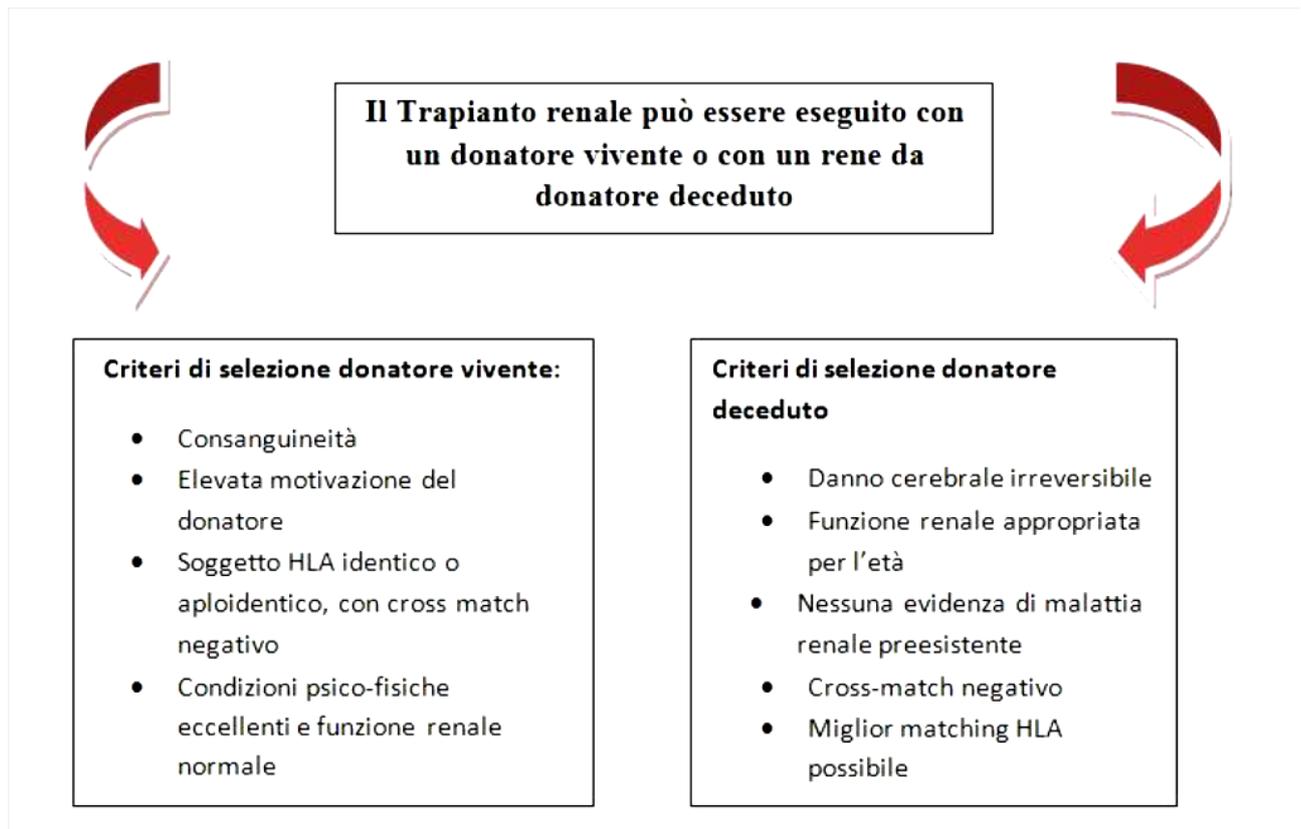


Figura 1 - Criteri di selezione del donatore nelle due tipologie di trapianto renale

Nonostante i notevoli miglioramenti nella gestione dei pazienti trapiantati, il problema della carenza di organi esiste ed è considerato uno dei principali limiti alla sua applicazione. In quest'ottica e considerando l'aumento della durata media della vita nella società, si stanno compiendo numerosi sforzi volti ad estendere i criteri di selezione dei donatori cadavere, facendo ricorso anche all'impiego dei cosiddetti donatori "marginali", che in passato sarebbero stati ritenuti non idonei per una serie di caratteristiche quali ad esempio l'età avanzata, ipertensione arteriosa, diabete mellito o patologie cardiovascolari. Il razionale alla base dell'impiego di questi donatori consiste nel fatto che il trapianto da donatore marginale migliora la sopravvivenza a lungo termine del ricevente, che supera quella dei candidati rimasti in lista d'attesa, pur essendo però inferiore a quella di pazienti sottoposti a trapianto da donatore standard o "ideale". Resta tuttavia indiscusso il ruolo preponderante svolto dalla qualità dell'organo trapiantato nell'influenzare l'evoluzione del trapianto stesso, che necessita di precisi criteri per il corretto inquadramento degli organi ritenuti marginali, siano essi candidati a trapianto singolo o doppio. È con questo obiettivo che sono presenti numerosi sistemi di classificazione e allocazione degli organi marginali per lo più basati sull'elaborazione di punteggi (score), esclusivamente clinici, puramente istologici o misti, che tengono conto dell'impatto che le diverse variabili, istopatologiche e cliniche hanno sull'evoluzione del graft. Il Centro Nazionale Trapianti in Italia ha un'organizzazione strutturata che considera la metodica di esecuzione di una biopsia pre-trapianto con applicazione dello score istologico di Karpinski in tutti i donatori appartenenti alla categoria

dei marginali. La Figura 2 riassume quali sono i fattori che influenzano per lo più l'outcome del trapianto renale [5].

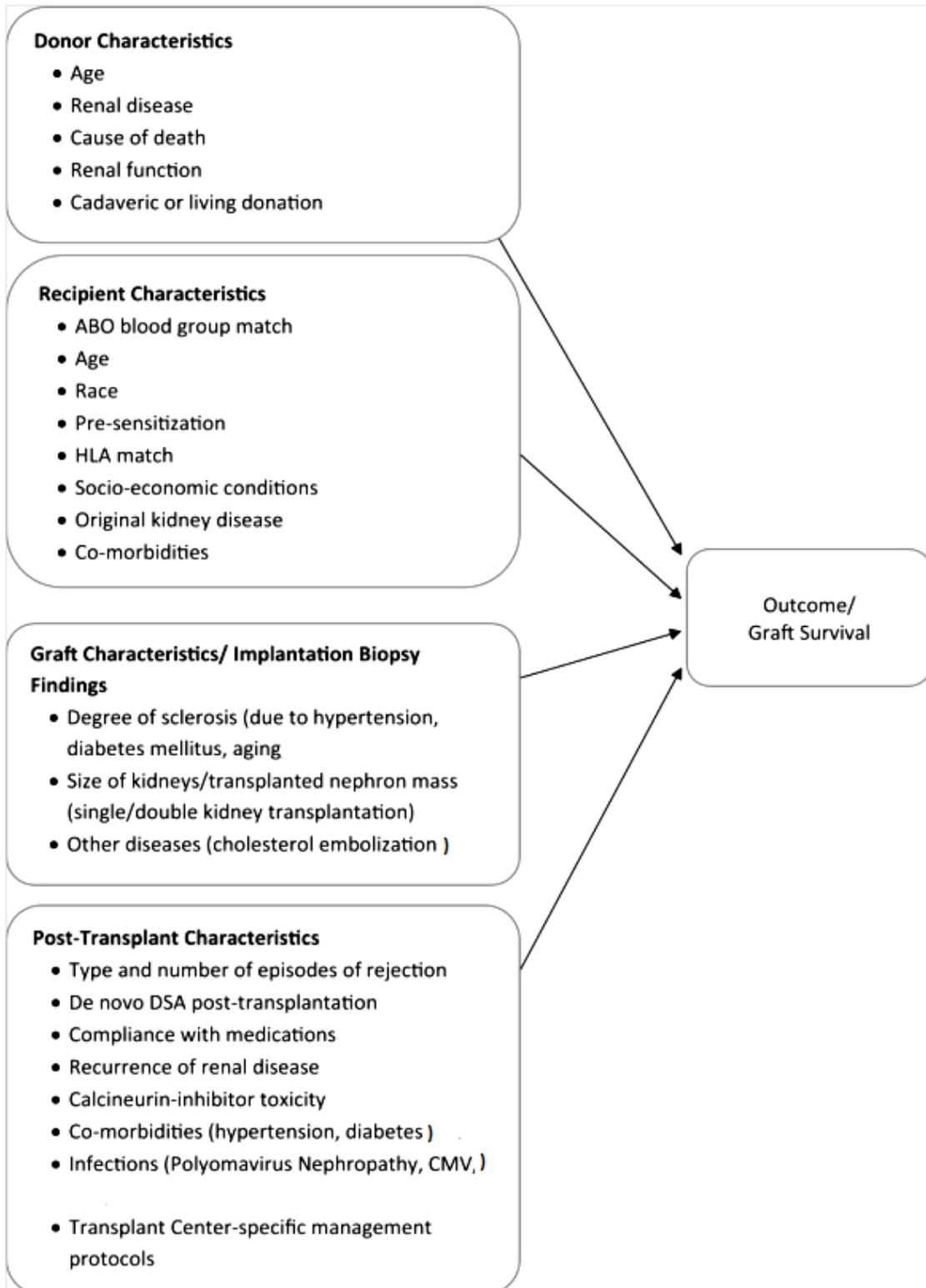


Figura 2 - Fattori che influenzano l'outcome del trapianto renale [5]

1.1.2. Rischio infettivo nel paziente trapiantato

Il rischio relativo di mortalità tra i pazienti trapiantati rispetto a quelli in terapia dialitica subisce ampie e significative modificazioni in relazione al tempo: nel periodo immediatamente successivo all'intervento è aumentato, come conseguenza dei rischi connessi alla procedura chirurgica e all'impiego di farmaci immunosoppressori ad alte dosi, mentre in seguito subisce un progressivo declino, risultante in una complessiva riduzione del tasso di mortalità che si mantiene nel lungo termine [6]. In questa forbice temporale riveste particolare importanza la componente infettiva con la quale il paziente trapiantato può venire in contatto. Il mix fra immunosoppressori e agenti infettivi infatti, rende i pazienti sottoposti a trapianto unici se paragonati alla popolazione generale. Quando questi pazienti vengono trattati con agenti immunosoppressori, i segni infiammatori classici e i sintomi associati all'infezione sono attenuati, così, per esempio, febbre o leucocitosi non sono sempre presenti e quindi le infezioni in questi pazienti possono non essere riconosciute per lunghi periodi di tempo, ritardando la diagnosi ad una fase avanzata, aumentando così il rischio di morbilità e mortalità.

Le infezioni più comunemente riscontrate nei pazienti sottoposti a trapianto renale sono la *Klebsiella pneumoniae*, lo *Streptococcus pneumoniae* e virus respiratori acquisiti in comunità, così come l'infezione causata da citomegalovirus (CMV), polmonite da *Pneumocystis carinii* (PJP), *Nocardia*, e *Aspergillus* [7]. Sia l'induzione, sia il mantenimento dell'immunosoppressione hanno un impatto critico sul rischio di infezioni post-trapianto [8], esse seguono, in gran parte, schemi prevedibili in relazione all'andamento del trapianto nel tempo, alla guarigione della ferita chirurgica e alla riduzione dell'immunosoppressione, inoltre, la riattivazione di infezioni latenti, che di solito si verifica nei primi 180 giorni dopo il trapianto, va attentamente valutata [9]. Ci sono molti fattori che influenzano il rischio di infezione nei soggetti trapiantati, anche se alcuni di questi fattori sono presenti nel donatore o ricevente prima del trapianto, mentre altri sono derivati da eventi che si verificano durante o dopo il trapianto. Un'accurata valutazione di questi fattori di rischio (Figura 3) post trapianto comprende:

- ❖ Infezioni latenti e attive nell'organo ricevente e/o nel donatore: Le infezioni derivate dal donatore svolgono un ruolo importante nelle infezioni post-trapianto. Un'attenta selezione dei potenziali donatori è fondamentale. Entrambe le categorie di pazienti, i donatori nel trapianto da vivente ovvero i riceventi, sono regolarmente sottoposti a screening per le infezioni latenti comuni. Inoltre, sono valutati anche i patogeni geograficamente importanti, come la tubercolosi (nel caso di donatori viventi), *Trypanosoma cruzi*, *Brucella*, e *Strongyloides* [10].
- ❖ Esposizioni di assistenza sanitaria prima e dopo il trapianto: La maggior parte delle infezioni diagnosticate nel primo mese successivo al trapianto di rene vengono contratte in ospedale e derivano da complicazioni della procedura chirurgica o da un'infezione del donatore non riconosciuta o non trattata [11]. I batteri e funghi sono i patogeni più comuni e l'acquisizione di batteri MDR (Multiple drug resistance) è una delle principali preoccupazioni poiché la presenza di questi microrganismi è associata ad un aumento della

morbilità e mortalità del paziente [12]. Circa il 3-13% dei pazienti sottoposti a trapianto di organi solidi in aree endemiche di Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) possono sviluppare varie infezioni e il sito di infezione è correlato con l'organo trapiantato. Un esempio è rappresentato dai pazienti trapiantati infettati dalla *Klebsiella pneumoniae* (KPC) il cui tasso di mortalità a 30 giorni è del 36%, ed aumenta sino al 58% a 180 giorni [13].

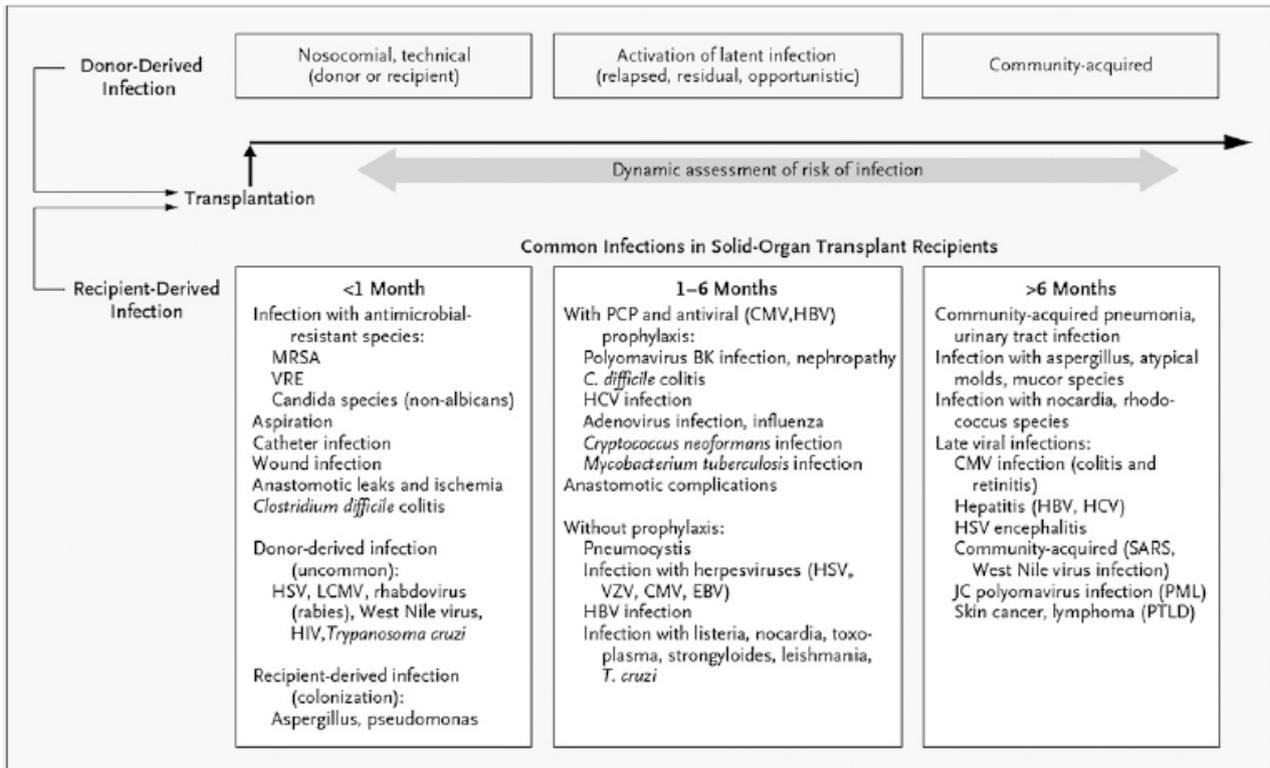


Figura 3 - Timing infettivo del paziente trapiantato

I problemi post-operatori e nosocomiali, possono persistere dopo il primo mese e le infezioni opportunistiche pongono la sfida più grande per il ricevente del trapianto. Per contenere questa eventualità i pazienti vengono sottoposti ad una profilassi antimicrobica. A 6 mesi dal trapianto renale, in assenza di complicanze maggiori, vi è una riduzione dell'immunosoppressione e il potenziale rischio di infezioni batteriche risulta ridotto. In questo periodo, i pazienti sono più soggetti ad essere infettati da organismi endemici per la comunità come ad esempio: *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella*, le altre infezioni legate all'esposizione ambientale includono *Nocardia*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*, ognuna delle quali può avere manifestazioni lievi nel corso di molti mesi e può, purtroppo, essere diagnosticata in ritardo [8].

1.2. I Polyomavirus

I Polyomavirus (PyVs) sono piccoli virus a DNA, icosaedrici e privi di envelope, che infettano un gran numero di vertebrati [14]. I primi due polyomavirus umani (HPyVs), JCV e BKV, il cui nome

deriva dalle iniziali dei soggetti in cui vennero isolati per la prima volta, furono identificati nel 1971, il primo nel cervello di un paziente con linfoma di Hodgkin e leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) [15], ed il secondo nelle urine di un paziente sottoposto a trapianto renale [16]. Negli ultimi anni, è aumentato l'interesse per i PyVs nell'induzione di forme patologiche e tumorali, a causa del sostanziale incremento del numero di nuovi isolati genetici virali scoperti. Pur avendo un'organizzazione strutturale ben conservata, i PyVs hanno uno spettro d'ospite ristretto ed una certa specificità cellulare. Questi limiti sembrano essere dovuti, a livello extracellulare, dalla presenza o meno di recettori sulla superficie della cellula ospite e, a livello intracellulare, dalla presenza o meno di fattori cellulari dell'ospite che permettano l'espressione dei geni virali ed il completamento del ciclo vitale del virus [17,19]. Sperimentalmente, la ristrettezza d'ospite e la specificità cellulare possono essere superate, e, quindi, il rischio di trasformazione oncogena aumenta tipicamente a spese della replicazione litica; la trasformazione oncogena è mediata dalle proteine precoci dei PyVs, chiamate antigeni T, attraverso le quali riescono ad aggirare i controlli del ciclo cellulare al fine di replicare in modo efficiente. La trasformazione dei PyVs si basa sul disallineamento genetico o funzionale tra l'espressione dell'antigene T e le fasi successive del ciclo vitale virale caratterizzato dalla replicazione del DNA virale, espressione del gene tardivo, assemblaggio del virione ed eventualmente la lisi cellulare dell'ospite. I PyVs condividono diverse caratteristiche con i papillomavirus tra cui il potenziale oncogeno, ma non sono più classificati insieme ad essi nel genere Papova, ma separatamente nel genere Polyomavirus, della famiglia Polyomaviridae [19]. I virus appartenenti alla famiglia sono elencanti in Tabella 1 e sono [20]:

Specie Polyomavirus	Abbreviazioni
Simian Agent 12	SA12
Bat polyomavirus	BatPyV
B-lymphotropic polyomavirus	LPyV
BK polyomavirus	BKPyV
Bornean orang-utan polyomavirus	PyV1
Bovine polyomavirus-3	BPyV3
Bovine polyomavirus-1	BPyV1
Bovine polyomavirus-2	BPyV2
California sea lion polyomavirus	SLPyV
Equine polyomavirus	EPyV
Hamster polyomavirus	HaPyV
JC polyomavirus	JCPyV
Merkel cell polyomavirus	MCPyV
Murine pneumotropic virus	JCPyV
OMurine polyomavirus	MPyV
MW polyomavirus	MWPyV
Simian virus 40	SV40
Squirrel Monkey polyomavirus	SqPyV
Sumatran orang-utan polyomavirus	PyV2

Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus	TSPyV
Chimpanzee polyomavirus	ChPyV
Human polyomavirus 6	HPyV6
Human polyomavirus 7	HPyV7
Human polyomavirus 9	HPyV9
Human polyomavirus 12	HPyV12
KI polyomavirus	KIPyV
WU polyomavirus	WUPyV
Avian polyomavirus	APyV
Canary polyomavirus	CaPyV
Crow polyomavirus	CPyV
Finch polyomavirus	FPyV
Simian virus 12	SV12
Goose hemorrhagi polyomavirus	GHPyV

Tabella 1 - Specie della famiglia dei PyVs

1.2.1. Struttura del genoma dei PyVs

I virus appartenenti alla famiglia dei Polyomaviridae, presentano un'elevata percentuale di omologia, pur differenziandosi notevolmente tra loro, sia per il comportamento biologico sia per le manifestazioni patologiche, nel caso del Polyomavirus BK, ad esempio, il grado di omologia è del 75% con JCV e del 70% con SV40. I Polyomavirus, così come gli altri virus a DNA, entrano nella cellula per endocitosi penetrando dapprima nel citoplasma e successivamente nel nucleo delle cellule bersaglio, dove la replicazione del DNA virale può avere luogo. Nel nucleo i virus perdono il capsido e danno inizio al loro ciclo replicativo, che si sviluppa in tappe successive.

Il genoma dei Polyomavirus è costituito da un'unica molecola di DNA a doppia elica di circa 5000 paia di basi con variazioni specifiche del genotipo osservato; questo minicromosoma, di forma circolare, complessato con le proteine istoniche cellulari H2A, H2B, H3 e H4, può essere diviso in tre regioni funzionali (Figura 4) [21] :

❖ Early coding region (regione codificante precoce)

È la prima parte del genoma ad essere trascritta e tradotta nel ciclo vitale del virus. Si tratta di una porzione di DNA di 2.4 kbp che codifica per due proteine regolatrici virali chiamate Tumor antigen (o semplicemente T-antigen). Queste proteine sono prodotte per splicing alternativo a partire da un comune precursore di mRNA e sono denominate, in base alla loro dimensione, large T antigen e small t-antigen (T-Ag e t-Ag). Il Large T-antigen è considerato il regolatore del processo infettivo ed è una proteina provvista di molteplici attività enzimatiche e di un'elevata capacità di legare sia il DNA sia le numerose proteine cellulari. Queste caratteristiche rendono ragione del ruolo fondamentale del large T-antigen nel regolare la produzione di mRNA precoce, nel dare inizio alla replicazione del DNA virale e nell'avviare la trascrizione dei geni tardivi attraverso l'attivazione dei promotori virali tardivi, sfruttando i fattori di trascrizione cellulari; legandosi alla pRb (retinoblastoma susceptibility protein) nella sua forma iperfosforilata. Questo complesso

promuove il prematuro rilascio del fattore di trascrizione EF2, che stimola le cellule quiescenti a entrare nella fase S del ciclo cellulare e, dopo aver stabilito un adeguato ambiente cellulare, recluta direttamente il complesso DNA polimerasi della cellula ospite per iniziare la sintesi bidirezionale di DNA virale. Il Large T-antigen rappresenta, quindi, un elemento fondamentale per il virus in quanto contiene domini multipli, alcuni dei quali inattivano proteine della famiglia del retinoblastoma o di p53, sovvertendo il processo di apoptosi. Numerosi studi hanno dimostrato che T-Ag è, tra le proteine codificate dal virus, il principale bersaglio della risposta immunitaria T cellulare. Nel sangue di donatori sani ma con anticorpi diretti contro il virus, troviamo infatti linfociti T CD8+ diretti contro large T-Antigen. Diverso è il ruolo dello small t-antigen, probabilmente coinvolto nella trasformazione cellulare e di ausilio per l'attività di large T Antigen. Quanto sopra esposto è solo un'ipotesi, in quanto il ruolo di questa proteina non è stato completamente chiarito dal momento che alcuni esperimenti hanno dimostrato che la replicazione virale procede anche in sua assenza [22].

❖ Late coding region (regione codificante tardiva)

E' un segmento di DNA di 2.3 kb, contenente le informazioni genetiche per le proteine strutturali del capsido: la proteina maggiore (VP1) e le due proteine minori (VP2 e VP3), sono derivate da un unico mRNA precursore attraverso un processo di splicing alternativo. La regione codificante tardiva codifica anche per una proteina denominata "agnoproteina", il cui ruolo nel ciclo replicativo dei Polyomavirus rimane ancora da chiarire. Le interazioni dirette tra T-Ag e agnoproteina sembrano modulare la replicazione virale e la trascrizione del virus durante l'infezione [22].

❖ Transcriptional control region (regione regolatoria non codificante)

La regione non codificante regolatrice (NCCR) misura 300-500 bp ed è collocata tra le due regioni precedenti. Questo segmento di DNA contiene la sequenza di inizio della replicazione virale (ori), la TATA box, il sito di legame per large T antigen, i siti di legame per i fattori di trascrizione cellulari, un promotore e un potenziatore per le trascrizione dei geni precoci e tardivi. La regione enancher di BKV, ad esempio, consiste in tre ripetizioni di 68 bp che sono soggette a delezioni e riarrangiamenti nelle diverse varietà di BK (nella varietà archetipale di BKV, per esempio, è stata trovata nella NCCR una sola sequenza di 68 bp) [22].

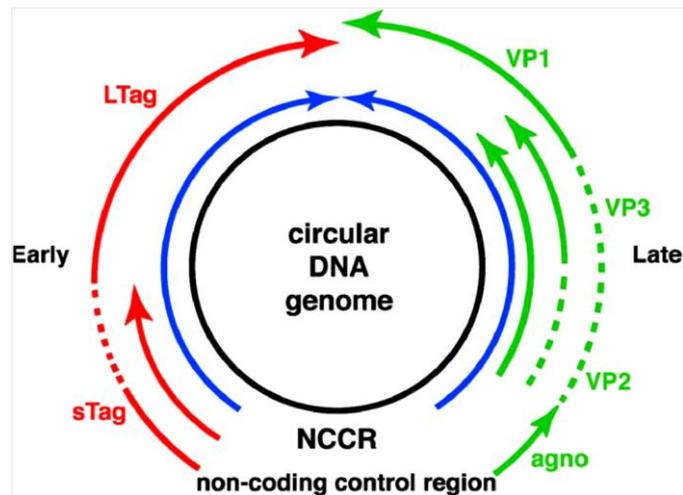


Figura 4 - Organizzazione del genoma dei PyVs

1.2.2. SV12

Il simian virus 12 (SV12) è stato isolato per la prima volta da una coltura di cellule renali derivate dal *Cercopithecus pygerythrus*, una scimmia tipica del Sud Africa. Successivamente, si è scoperto che anche un'alta percentuale di scimmie dei generi *Papio ursinus* e *babbuini chacma*, erano sieropositivi per SV12. Come altri poliomavirus, SV12 trasforma le cellule in coltura ed i primi studi hanno dimostrato è un poliomavirus strettamente correlato a SV40, JCV e BKV [23]. Tuttavia la letteratura per quanto concerne questo genotipo è davvero scarsa e ad oggi non sono note associazioni patologiche riportate.

1.3.1 Papillomavirus

Papillomavirus (HPV) è un virus della famiglia Papovaviridae. L'HPV è stato scoperto sia nell'uomo che negli animali. Più di 300 HPV sono stati identificati e completamente sequenziati, compresi oltre 200 HPV umani [24,25]. L'HPV è un virus specie-specifico con un elevato tropismo tissutale: ha la capacità di infettare i tessuti epiteliali dell'epidermide e della mucosa, generando lesioni specifiche. A questo proposito, i genotipi HPV sono stati divisi in due gruppi distinti: cutanei e mucosali. Gli HPV cutanei sono associati a lesioni (verruche) su mani e piedi (1,2 e 4 genotipi), mentre altri genotipi HPV sono associati a verruciformi epidermodisplasia (5,8,9,9,12,14,15,17,19-25,36,46 e 47 genotipi). I genotipi 5 e 8 sono associati anche al cancro della pelle [26]. Gli HPV mucosali, danno lesioni del tratto orale, respiratorio e anogenitale. Si dividono in basso e alto rischio, a seconda della loro capacità oncogena. Tra i genotipi a basso rischio, i genotipi 6,11,40,42,43,44,54,61,70 e 72 sono classificati come genotipi a basso rischio, che possono portare a lesioni della mucosa genitale benigne. I genotipi 16,18, 31, 33, 35, 52, 58, 67 sono considerati ad alto rischio; il genotipo HPV16 è più frequentemente associato al cancro della cervice uterina [27]. L'utilizzo di algoritmi filogenetici, in grado di confrontare sequenze genomiche multiple, ha permesso di suddividere i genotipi HPV in 37 generi. Questi dati sono stati ottenuti analizzando l'omologia di sequenza esistente tra le sequenze nucleotidiche della regione L1 ORF

del genoma. Gli HPV umani appartengono a 5 generi: Alfa, Beta, Gamma, Mu e Nu, a cui corrispondono diverse associazioni patologiche (Figura 5) [28]. L'HPV è considerato un nuovo genotipo quando l'omologia esistente tra le sue sequenze di DNA e quelle dei genotipi già classificati non supera il 90%. I virus con un'omologia superiore al 90% ma inferiore al 98% sono definiti sottotipi e quelli con un'omologia compresa tra il 98% e il 100% sono definite varianti [29].

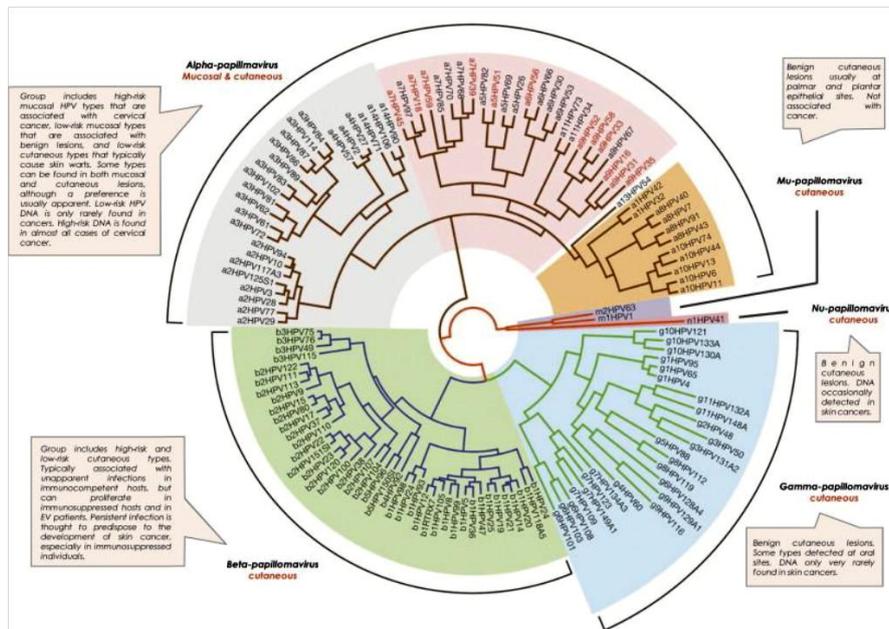


Figura 5 - Generi dei Papillomavirus

HPV è un virus con DNA circolare a doppio filamento di circa 8000 coppie di basi con un capsidico icosaedrico privo di envelope. Contiene tre regioni distinte: late (L), early (E) e upstream regulatory region (URR) o LCR (long control region). La regione L comprende due geni: L1 (capsidico virale maggiore) e L2 (capsidico virale minore), che codificano le proteine strutturali necessarie per la formazione del capsidico virale nella fase finale della replicazione. La regione E contiene sette geni espressi nella fase iniziale del ciclo replicativo, che codificano per le proteine non strutturali, con varie funzioni regolatorie chiamati da E1 a E7. Le regioni L ed E sono separate da URR, una regione di circa 1000 coppie di basi che contiene un certo numero di elementi cis necessari per la regolazione dell'espressione genica, la replicazione del DNA e l'incapsulamento del genoma virale.

1.3.1. Struttura del genoma degli HPV

L'infezione da HPV avviene attraverso il contatto iniziale del virus con lo strato superficiale dell'epitelio squamoso multistrato. L'HPV non codifica una DNA polimerasi, ma utilizza la DNA polimerasi dell'ospite cellulare. Per questo motivo, l'HPV si replica solo nelle cellule di differenziazione. La sintesi del DNA virale, la produzione di proteine del capsidico e l'assemblaggio dei virioni, avviene solo a livello dei cheratinociti. L'epidermide è composta da 5 diversi strati: basale, spinoso, granuloso, lucido e corneo. Lo strato corneo rappresenta la fase terminale di

differenziazione dei cheratinociti, corrispondente ad uno specifico stadio del ciclo vitale virale. L'infezione si verifica quando il virus raggiunge lo strato basale. Ciò è reso possibile da piccole ferite o abrasioni della mucosa dell'ospite. I recettori utilizzati dal virus per entrare in contatto con le cellule e penetrare al loro interno non sono ancora stati identificati con chiarezza. È stato difficile studiare i meccanismi attraverso i quali l'HPV entra nelle cellule e stabilisce un'infezione produttiva, a causa della difficoltà di produzione del virus sia in vivo che in vitro. L'interazione tra HPV e superficie cellulare è stata quindi indagata utilizzando gli pseudo-virioni formati da proteine L1 e L2 autoassemblate in sistemi di espressione eterologa (VLP: particelle simili ai virus) e un plasmide reporter al posto del genoma [30]. L'HPV può legarsi non solo nelle cellule epiteliali squamose, ma anche ad altri tipi di cellule. Ciò indica che il tropismo marcato dall'HPV per i cheratinociti non è dovuto alla specificità del recettore [31]. Integrin $\alpha 6$ è stato il primo candidato come possibile recettore HPV, secondo studi che utilizzano il VLP [32]. Le VLPs si legano all'integrina e l'uso di anticorpi diretti contro $\alpha 6$ blocca il legame del virus alla cellula. L'Integrina $\alpha 6$ collabora con le sottounità $\beta 1$ e $\beta 4$ dell'integrina β , situate sulla superficie cellulare. L'integrina $\alpha 6\beta 1$ è espressa su un'ampia varietà di cellule, incluse piastrine, linfociti, cellule endoteliali, mentre l' $\alpha 6\beta 4$ si trova su cellule epiteliali, mesenchimali e neuronali. L'HPV può legarsi a entrambi i tipi di integrina, ma preferibilmente al profilo $\alpha 6\beta 4$ [33]. L'espressione di queste integrine non è comunque necessaria per l'ingresso del virus nelle cellule, perché alcuni HPV entrano in cellule prive di questi recettori. È stato osservato che questi virus si legano ad eparina e glicosaminoglicani, seguiti da un successivo legame e internalizzazione dei recettori [34]. Dopo il legame dei recettori, i virioni entrano lentamente nel compartimento citoplasmatico [35], si disassemblano nei lisosomi e quindi il DNA virale viene trasferito e trasportato nel nucleo dalla proteina L2 del capsido. Il ciclo replicativo del virus può essere suddiviso in uno stadio non produttivo o iniziale e uno stadio produttivo, o tardivo, relativo allo stato di differenziazione delle cellule ospiti. Nella fase non produttiva, il DNA dell'HPV viene mantenuto in forma episomale e il promotore precoce inizia ad esprimere le proteine E1 ed E2 che innescano la replicazione del genoma virale. Nelle cellule basali infette, il DNA viene mantenuto in un basso numero di copie episomali, circa 10-100 genomi per cellula. In questa fase, il numero di copie genomiche rimane costante e la replicazione virale avviene contemporaneamente alla cellula ospite: il virus utilizza le strutture e le componenti cellulari ospiti per la replicazione del suo DNA. Questo tipo di replicazione permette al virus di stabilire un'infezione persistente nelle cellule basali dell'epidermide, inducendo così un'infezione latente. Un gruppo di queste cellule lascia la membrana basale per stratificarsi e differenziarsi, rendendo possibile l'ingresso del virus negli strati superiori dell'epidermide. A questo livello inizia la fase produttiva del ciclo di replicazione dell'HPV che interessa le cellule degli strati superiori dell'epitelio (strato granulare). Queste cellule sono in avanzato stato di differenziazione e non c'è la sintesi del DNA cellulare, ma è presente un'intensa replicazione del DNA virale (replicazione vegetativa), con conseguente perdita del controllo del numero di copie genomiche, fino a migliaia di copie per cellula. Avviene anche l'espressione del gene virale tardivo, la sintesi delle proteine del capsido e l'assemblaggio dei virioni. La formazione completa del virus avverrà nello strato più esterno dell'epitelio (strato corneo), e i virus assemblati vengono espulsi nell'ambiente esterno, quando le cellule epiteliali esfoliano. I virioni rilasciati all'esterno iniziano una nuova infezione [36].

1.4. Gli esosomi

Gli esosomi sono vescicole di dimensioni nanometriche (30-150 nm) rilasciate dalla maggior parte delle cellule presenti nei vari fluidi biologici come sangue, saliva e urine [37-40]. Queste vescicole trasportano proteine, RNA messaggero (mRNA) e microRNA (miRNA) e possono trasferire il loro carico alle cellule riceventi, alterando la composizione biochimica e i pathways di segnalazione nelle stesse [41-42]. Gli esosomi sono stati scoperti quasi 35 anni fa quando nel 1983, due gruppi di ricerca distinti segnalavano in modo indipendente che i recettori della transferrina nei reticolociti erano associati a piccole vescicole di dimensioni di circa 50 nm di diametro [43-44]. Le funzioni di queste piccole vescicole rimasero sconosciute fino al 1996, quando Raposo e colleghi osservarono che gli esosomi secreti dalle cellule B del sistema immunitario stimolavano i cloni delle cellule T CD4+ umane in modo antigene-specifico [45]. Nel 2007 Valadi e colleghi, evidenziarono che gli esosomi isolati da mastociti umani e murini contenevano mRNA e miRNA [46], ipotizzando per la prima volta che tali vescicole potessero trasferire i loro RNA alle cellule adiacenti. Questa significativa scoperta permette di attribuire agli esosomi un ruolo nella comunicazione intercellulare. Studi recenti hanno inoltre evidenziato che gli esosomi rilasciati dalle cellule tumorali possono essere coinvolti nel processo metastatico attraverso il trasferimento del loro contenuto (RNA e proteine cancro- specifiche) a cellule normali [47-51]. In una serie di studi condotti fra il 2008 e il 2010 diversi gruppi hanno dimostrato che i pazienti affetti da cancro ovarico e al seno presentano un numero maggiore di esosomi rispetto a soggetti sani, suggerendo che il cancro potrebbe aumentare la produzione degli esosomi per assicurarsi un vantaggio selettivo a discapito delle cellule normali [52-54].

Grazie alla loro capacità di rappresentare lo stadio metabolico della cellula d'origine e il loro ruolo cruciale nei principali processi patologici, gli esosomi sono stati presi in considerazione come potenziali biomarcatori, nuovi e promettenti per un'ampia gamma di malattie, compresi diversi tipi di cancro [55-56].

Pertanto, l'isolamento accurato, la quantificazione e l'analisi di esosomi malattia-specifici hanno guadagnato molta attenzione negli ultimi anni da parte della comunità scientifica. A causa della complessa natura della matrice del campione e delle proprietà fisico-chimiche degli esosomi stessi, il loro accurato isolamento dai fluidi corporei pone sfide significative [57,58]. Negli ultimi decenni, vari metodi convenzionali e non, sono stati impiegati nel tentativo di isolarli, ad esempio la centrifugazione secondo gradiente di densità, l'ultrafiltrazione e la separazione immunologica [59-64]. Tra questi metodi, la centrifugazione a densità differenziata è l'approccio più utilizzato per estrarre gli esosomi dalle cellule derivate da mezzi di coltura e fluidi corporei. [65] Attualmente, sono anche disponibili diversi kit commerciali di isolamento esosomiale. Questi kit evitano gli step di precipitazione differenziale delle nanovesicole (NV) che richiedono molto tempo, e sfruttano il polietilenglicole o composti simili per isolare le NV. Tuttavia con queste metodiche è stato osservato anche l'isolamento di particelle non vescicolari [66].

1.5. Biogenesi degli Esosomi

Nel 1987, il termine "esosoma" è stato coniato per descrivere un gruppo di vescicole di dimensioni ridotte (30-150 nm) che si formano all'interno dell'endosoma e vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare quando gli endosomi si fondono con la membrana cellulare [67]. Successivamente sono state descritte una serie di vescicole extracellulari (EVs), classificate in base alla loro origine cellulare, alle loro funzioni, e/o biogenesi [68,69]. Tuttavia, la nomenclatura per i diversi tipi di EVs rimane poco chiara in vari lavori [70]. In conformità con il pathway biogenetico della secrezione delle cellule, le vescicole extracellulari possono essere classificate in tre categorie principali: [71]

- ❖ esosomi (≈30-150 nm di diametro), piccole vescicole che sono rilasciate per esocitosi quando i corpi multivesicolari (MVB) si fondono con la membrana plasmatica;
- ❖ microvescicole, vescicole con un diametro di ≈50-1000 nm che sono direttamente secrete dalla membrana plasmatica;
- ❖ corpi apoptotici (1000-5000 nm di diametro), relativamente più grandi, che vengono rilasciati dalle cellule morenti.

Diversi sono i meccanismi coinvolti nella biogenesi degli esosomi e nella selezione del carico di proteine e RNA da assemblare al loro interno. Come descritto nella Figura 6, un ruolo cruciale è quello dell'endosoma. Un endosoma, un complesso legato alla membrana delle cellule eucariotiche, è composto da due differenti compartimenti: endosomi precoci e tardivi. Quando gli endosomi precoci maturano nei tardivi, sia la loro posizione (dal citoplasma verso il nucleo) che la loro forma (da tubulari a sferici) subiscono delle variazioni [71]. Inoltre all'interno del lume degli endosomi tardivi, mediante un processo di gemmazione interna della membrana endosomiale, si formano delle vescicole intraluminali (ILV) [72]. Questi endosomi sono conosciuti con il nome di corpi multivesicolari (MVBs). I MVBs hanno due destini possibili: o si fondono con il lisosoma o con la membrana plasmatica. Nel primo caso, il loro contenuto verrà degradato all'interno del lisosoma mediante idrolisi. In alternativa, i MVBs possono fondersi con la membrana plasmatica rilasciando il loro contenuto (ILVs) all'esterno dello spazio extracellulare [73]. Queste vescicole rilasciate sono note in letteratura con il nome di esosomi. Essi possono essere secreti principalmente attraverso due meccanismi: un rilascio attraverso il sistema del trans-Golgi e un rilascio inducibile. Diverse proteine della famiglia Rab sono coinvolte in questo processo e le principali sono Rab27a e Rab27b. Inoltre l'attivazione della proteina p53, stimola e aumenta il tasso di secrezione degli esosomi agendo sull'attività dei fattori di trascrizione di alcuni geni fra cui TSAP6 e CHMP4C [74].

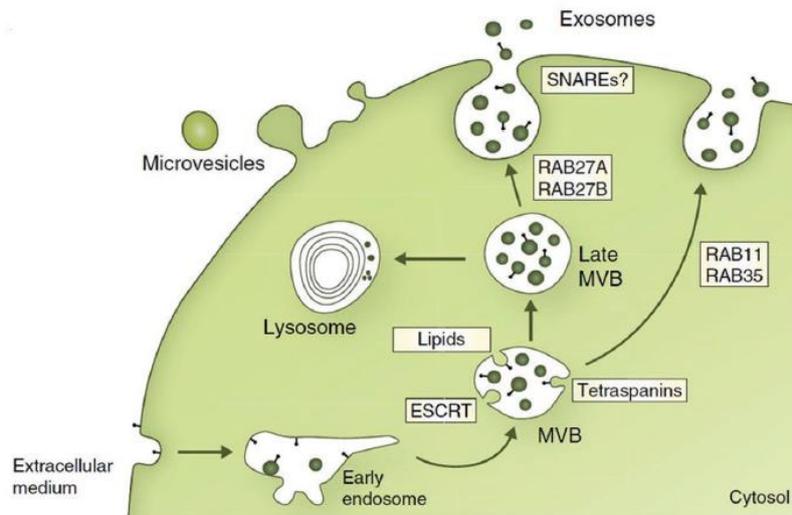


Figura 6 - Biogenesi degli esosomi. [5]

1.6. Contenuto degli esosomi

Gli esosomi contengono una varietà di molecole come proteine, mRNA, noncoding RNAs (ncRNAs), DNA e lipidi (Figura 7) [75].

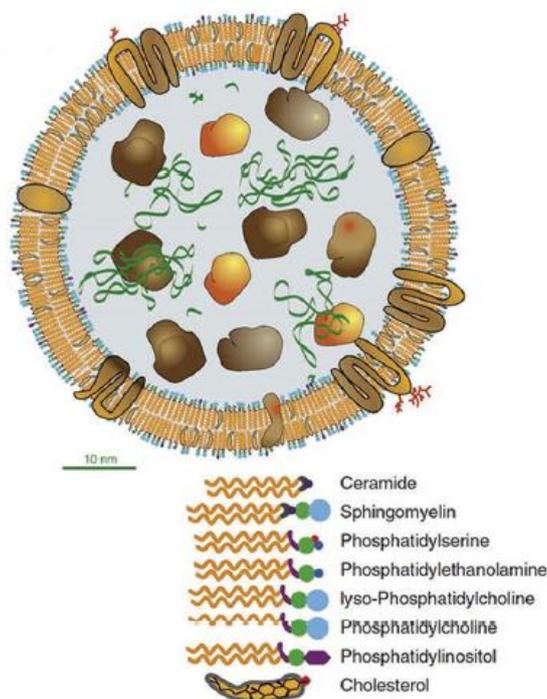


Figura 7 - Rappresentazione del contenuto di un esosoma [39].

I vari tipi di esosomi isolati con il susseguirsi degli studi, sono stati collezionati in due database specifici per le NV: ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>) e Vescilepedia (<http://www.microvesicles.org/>) [76]. Dal 2009, in questi database sono state depositate 41860 proteine, più di 7540 RNA e 119 molecole lipidiche associate a esosomi. E' da sottolineare tuttavia

che questo tipo di sottomissione è controllata dal solo “submitter” e nessun controllo qualità della nuova entry o validazione della veridicità della sottomissione è richiesta all’operatore. Inoltre, la presenza di diversi metodi di isolamento delle vescicole potrebbe alterare i risultati in quanto molto spesso insieme agli esosomi si co-purificano altre molecole, che costituiscono degli artefatti. Una nuova recente community, EVpedia (http://student4.postech.ac.kr/evpedia2_xe/xe/), tenta di incorporare anche alcune di queste informazioni aggiuntive [77].

1.6.1. Proteine

Il contenuto proteico degli esosomi riflette la loro origine negli endosomi e varia in rapporto al tipo cellulare in cui hanno avuto origine [78]. Tutti gli esosomi condividono un piccolo set di proteine fra cui:

- ❖ Proteine transmembrana (CD9, CD63 e CD81) appartenenti alla famiglia delle trasspanine;
- ❖ Proteine che partecipano alla morte cellulare programmata (PDCD61Ps);
- ❖ Proteine coinvolte nel trasporto degli esosomi (Tsg101);
- ❖ Proteine del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC) [79-81].

Le proteine che dipendono dalle cellule da cui si originano appartengono invece alle seguenti categorie:

- ❖ Proteine del citoscheletro;
- ❖ Proteine di trasporto di membrana;
- ❖ Proteine da shock termico;
- ❖ Annessine coinvolte principalmente nella regolazione delle variazioni del citoscheletro e nel mediare i meccanismi di fusione della membrana;
- ❖ Proteine di membrana della famiglia Wnt che attivano il pathway associato nelle cellule target;
- ❖ GTPasi, appartenenti alla famiglia delle proteine Rab, che innescano la fusione della membrana.

Ad oggi, tutte le proteine associate ad esosomi identificate e depositate nei database, sono proteine del citoplasma, della membrana plasmatica o della membrana dell’endocita d’origine. Non sono state individuate, invece, proteine di origine nucleare, mitocondriale, del reticolo endoplasmatico e dell’apparato di Golgi [82-86].

1.6.2. Acidi Nucleici

L’osservazione che gli mRNA e i miRNA possono essere secreti dagli esosomi ha generato l’entusiasmo della comunità scientifica. Esperimenti in vitro hanno mostrato come alcuni mRNA contenuti negli esosomi possano essere tradotti in proteine nelle cellule target. Queste evidenze suggeriscono che tali vescicole abbiano un ruolo nel trasferimento intracellulare e intercellulare di materiale genetico. Una delle principali scoperte in tal senso, è che non tutti gli mRNA prodotti dalla cellula finiscono negli esosomi, ma che esiste un meccanismo selettivo che controlla il

caricamento di specifiche specie di RNA all'interno delle vescicole. Valadi e colleghi nel 2007, sono stati i primi a documentare la presenza di acidi nucleici in vescicole di mastociti umani. Successivamente altri studi hanno ampliato questo risultato a diversi tipi cellulari fra cui cellule dendritiche, cellule tracheobronchiali, linfociti B e T, cellule neoplastiche di polmone, esofago e stomaco e cellule di adenocarcinomi pancreatici [87-90]. Alcuni studi recenti hanno esteso la gamma di RNA contenuti nelle vescicole oltre che ai mRNA anche ai miRNA e ai ncRNA. Tuttavia, il meccanismo per il caricamento selettivo di queste specie negli esosomi è tutt'ora ignoto. Villarroya-Beltri e colleghi nel 2013, hanno identificato un sistema coinvolto nell'incapsulamento e nell'esportazione dei miRNA dagli esosomi rappresentato da piccole sequenze (EXOMotifs) over-esprese nei miRNA. Hanno inoltre dimostrato che la ribonucleoproteina A2B1 (hnRNPA2B1) lega i miRNA esosomiali attraverso il riconoscimento degli EXOMotifs e controllando di fatto il loro caricamento all'interno degli esosomi [91].

1.6.3. Lipidi

Gli esosomi trasportano oltre che proteine e RNA anche certi tipi di lipidi, che rivestono un ruolo cruciale nel mantenimento della loro attività biologica [92-94]. Essi possono essere distinti in:

- ❖ Ceramidi, implicati nella differenziazione degli esosomi dai lisosomi;
- ❖ Colesterolo;
- ❖ Altri sfingolipidi;
- ❖ Fosfogliceridi con lunghe catene di acidi grassi.

È stato inoltre dimostrato che gli esosomi potrebbero fornire prostaglandine alle cellule bersaglio. Tuttavia, la loro composizione lipidica non rappresenta la cellula madre. Ad esempio, gli esosomi sono arricchiti in sfingomielinina ma non di colesterolo rispetto alla cellula da cui hanno avuto origine [95].

1.7. Le funzioni degli esosomi

Come abbiamo già detto, gli esosomi sono secreti da molti tipi cellulari, circolano in differenti fluidi biologici (ad esempio urine, sangue e saliva) e trasferiscono il loro cargo alle cellule riceventi. Queste vescicole giocano un ruolo significativo in varie condizioni patologiche, come ad esempio diversi tipi di cancro, malattie neurodegenerative, malattie infettive, complicazioni della gravidanza, obesità e malattie autoimmuni [96-103] (Figura 8). Inoltre diversi studi hanno indicato che gli esosomi possono essere associati a infiammazione, coagulazione, angiogenesi e apoptosi [104]. In aggiunta è stato dimostrato che gli esosomi possono essere correlati allo sviluppo del cancro [105-109]. Infatti essi trasferendo il loro contenuto dalle cellule neoplastiche alle cellule normali controllano la progressione, la sopravvivenza e le metastasi tumorali, oltre che la resistenza farmacologica [110]. Kucharzewska e colleghi nel 2013, hanno dimostrato che gli esosomi derivati da glioblastomi maligni murini mediano la segnalazione intercellulare attraverso vie di segnalazione mediate dall'ipossia. Considerando che l'ipossia è il principale regolatore dello

sviluppo tumorale e della sua aggressività, è stato suggerito che gli esosomi rivestono un ruolo primario nella vascolarizzazione tumorale e nella comunicazione intertumorale ipossia-mediata, durante la progressione del cancro [111]. Inoltre, queste vescicole sono fondamentali per lo sviluppo delle nicchie premetastatiche. Queste ultime rappresentano l'opportunità per le cellule tumorali di colonizzare tessuti distanti dal tumore primario, al fine di promuovere l'inizio delle metastasi [112-116]. Inoltre, gli esosomi ricoprono un ruolo anche nella sopravvivenza del tumore permettendogli di sfuggire al controllo del sistema immunitario inibendo la proliferazione dei linfociti [109,117]. Risultati interessanti suggeriscono che vari tipi di agenti patogeni infettivi (ad esempio virus) possono usare gli esosomi per infettare le cellule. Gli Esosomi delle cellule dendritiche immature possono mediare l'infezione da HIV trasferendo le particelle del virus a cellule T CD4 + attraverso la via endosomica, evitando in tal modo l'identificazione del virus da parte del sistema immunitario innato [118]. Inoltre, le cellule infettate dal virus Epstein-Barr (EBV) rilasciano i miRNA funzionali di EBV negli esosomi che possono mantenere l'infezione attiva nella cellula madre e diffonderla alle cellule adiacenti [99].

La gravidanza è un'altra area di interesse per quanto riguarda il potenziale ruolo delle vescicole extracellulari e soprattutto gli esosomi. La segnalazione esosomiale è una via di segnalazione che media la comunicazione tra l'ambiente materno e quello fetale durante la gestazione [119-120]. Durante la gestazione, la placenta umana secreta esosomi nella circolazione materna a partire da 6-7 settimane di gravidanza. La concentrazione di esosomi che hanno origine da cellule placentari aumenta progressivamente durante la gestazione nella circolazione sanguigna materna [121]. La concentrazione di esosomi derivanti da placenta è più alta nelle gravidanze complicate da diabete gestazionale [102] e preeclampsia[100] rispetto alle gravidanze normali, specialmente durante il primo trimestre di gravidanza; quindi il profilo placentare degli esosomi presenti nel circolo materno nelle prime settimane di gestazione, potrebbe essere utilizzato per identificare le donne con un rischio maggiore per lo sviluppo di queste complicazioni [121].

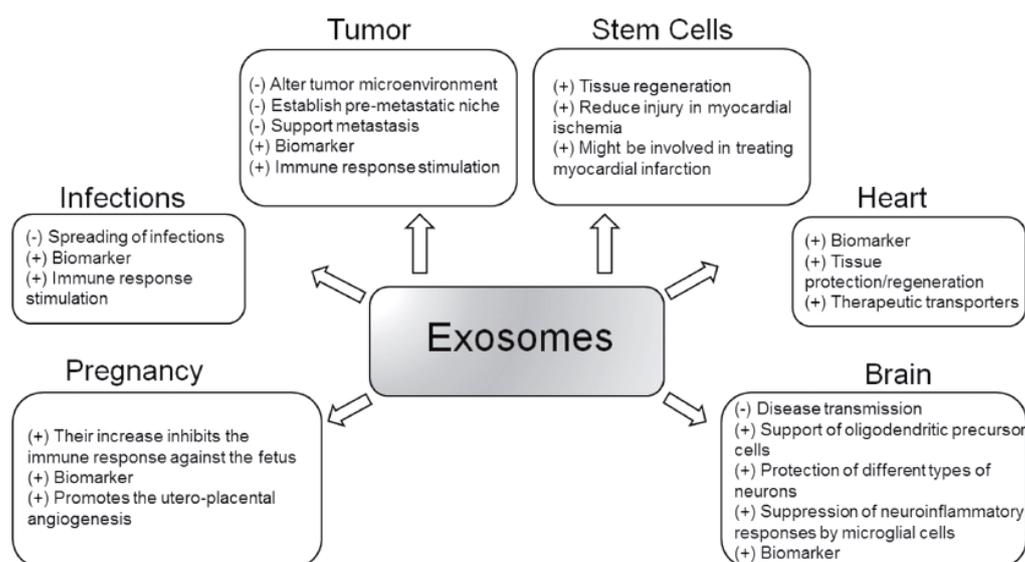


Figura 8 - Funzioni degli esosomi

1.8. Potenziale utilizzo degli esosomi come biomarkers e agenti terapeutici

Nel corso degli ultimi anni, diversi studi hanno dimostrato l'importanza del potenziale diagnostico e terapeutico degli esosomi e del contenuto esosomiale (ad esempio, acidi nucleici e proteine) in molte malattie compreso il cancro così come malattie cardiovascolari, neurodegenerative e malattie infettive.

1.8.1. Proteine esosomiali: biomarcatori di insorgenza e progressione di patologie

Come discusso nella sezione 1.3.1, gli esosomi contengono un'ampia varietà di proteine, tra cui le proteine coinvolte nella biogenesi dell'esosoma (ad es. complesso Alix, Tsg101 e ESCRT) ed endosomiali (annessine e flotillina); tetraspanine (ad esempio, CD9, CD63, CD63, CD81, e CD82) e proteine da shock termico (Hsp70 e Hsp90) (Tabella 2) [122].

Biofluid	Disease	Exosomal protein content	Reference
Plasma	Prostate cancer	Survivin	[138]
	Melanoma	CD63, caveolin-1, TYRP2, VLA-4, HSP70, HSP90	[11]
	Glioblastoma	Epidermal growth factor receptor VIII	[77]
	Ovarian cancer	CD24, EpCAM, CA-125, TGF β 1, MAGE 3/6	[163]
	Breast cancer	EDIL3, Fibronectin	[110,111]
Serum	Pancreatic cancer	Glypican-1	[115]
	Colorectal cancer	CD147, CD9	[109]
	Glioblastoma	EGFR, CD63, EGFRvIII	[169]
	Breast cancer	Survivin	[113]
	Prostate cancer	Survivin	[138]
Urine	Prostate cancer	PCA-3, TMPRSS2:ERG, PSA	[120]
	Bladder cancer	EGF, α subunit of Gs, resistin, retinoic acid-induced protein 3	[121]
Cell culture medium	Ovarian cancer	L1CAM, CD24, ADAM10, EMMPRIN, claudin	[122]

Tabella 2 - Proteine esosomiali per le applicazioni cliniche

In uno studio del 2015, Rice e colleghi, evidenziano la presenza di marcatori proteici esosomiali nelle linee di cellule tumorali derivate da prostata umana e mammella. Tutti i campioni testati erano positivi per CD9 e CD81 [123]. Recentemente, una serie di studi hanno avvalorato il ruolo delle proteine esosomiali come biomarcatori diagnostici del cancro al seno [124-126]. Per esempio, il lavoro di Rupp del 2011, ha dimostrato che il CD24 può funzionare come un marcatore specifico per il cancro al seno [126]. Un altro studio recente ha dimostrato che EDIL3 e la fibronectina nella popolazione esosomiale possono servire come promettenti biomarcatori precoci per la diagnosi di cancro al seno [125]. Proteine esosomiali sono state segnalate anche in altri tumori come quello della prostata, vescica, ovaie, pancreas e colon-retto [122,127,128]. Ne sono esempi:

- ❖ la survivina identificata in pazienti con il cancro alla prostata ma non in soggetti sani [130];
- ❖ Glypican 1 trovata esclusivamente nel siero di pazienti con cancro del pancreas ma non in campioni derivati da lesioni benigne del pancreas [129];
- ❖ CD81 aumentato nei pazienti con epatite C cronica rispetto ai controlli sani e ai pazienti in remissione [131].

1.8.2. RNA esosomiali: potenziali biomarcatori di insorgenza e progressione di patologie

Nonostante siano disponibili nella maggior parte dei fluidi biologici, l'impiego dei RNA come biomarcatori del cancro è lontano dall'essere adottato nella routine clinica. Questo è dovuto alla loro scarsa specificità e riproducibilità in diverse condizioni fisiologiche e patologiche. Inoltre, l'RNA è generalmente instabile a temperatura ambiente per la progressiva degradazione dell'RNA associata alla ribonucleasi [132]. Se l'RNA è ancora oggi oggetto di attente valutazioni, i miRNA esosomiali potrebbero rappresentare il bersaglio giusto per l'individuazione di vari biomarcatori diagnostici. Questo dipende dal fatto che i miRNA esosomiali sono protetti dalla degradazione RNasi dipendente e possono quindi essere stabilmente identificati in circolo. Dal 2007, anno in cui per la prima volta si evidenziarono miRNA legati ad esosomi, un numero sempre maggiore di studi ha dimostrato il loro coinvolgimento in diverse malattie, specialmente nel cancro [133], come riassunto schematicamente dalla Tabella 3.

Biofluid	Disease	Exosomal RNA content	Reference	
Plasma	Ovarian cancer	miR-21, -141, -200a, -200b, -200c, -203, -205, -214	[27]	
	Prostate cancer	miR-141, miR-375	[21,22]	
	Breast cancer	miR-21, -1246	[140,141]	
	Lung cancer	miR-17, -3p, -21, -20b, -223, -301, let-7f, -19a, -19b, -30b, -20a, 30e-3p, -378, -379, -139-5p, -200b-5p, -151a-5p, 629, -100, -154-3p	[142]	
	Esophageal cancer	miR-21, miR-1246	[19,143]	
	Liver cancer	miR-34a, -125b, -21	[155]	
Cell culture medium	Gastric cancer	Let-7 family miRNAs	[71]	
	Colorectal cancer	mRNAs	[144]	
	Hepatocellular carcinoma	miR-584, -517c, -378, -520f, -142-5p, -451, -518d, -215, -133b, -367	[145]	
	Prostate cancer	miR-4258, -221, -193a-3p, 30e, -1297, -129, -21, -485-3p	[146]	
	Lung cancer	miR-133b, -98, -181a, -21	[147]	
	Glioblastoma	miR-1469, -320b, -320c, -191, -222, Let-7a, -923, -1308, -2185, -351-5p, -25, -939, -30c, -422a, -221, -487a, -335, -4329	[148]	
	Breast cancer	miR-16, -1246, -451, -20	[149]	
	Renal fibrosis	miR-29c, CD2APmRNA	[34]	
Urine	Pancreatic cancer	miR-17-5p, -21	[19]	
	Ovarian cancer	miR-21, -141, -200a, -200c	[27]	
Serum	Prostate cancer	miR-141, -107, -375, -574-3p	[150]	
	Pancreatic cancer	miR-17-5p, -21	[151]	
	Breast cancer	miR-200a, -200c, -205, -101, -372, -373	[152]	
	Glioblastoma	miR-21, -574-3p, Snc RNA (RNU6-1)	[153]	
	Colon cancer	miR-4772-3p, let-7a, -1229, -1246, -150, -21, -223, -23a	[154]	
	Liver cancer	miR-34a, -125b, -21	[155]	
	Peripheral blood	Lung adenocarcinoma	miR-17-3p, -21, -106a, -146, -155, -191, -192, -203, -205, -210, -212, -214	[127]

Tabella 3 - I miRNA esosomiali per le applicazioni cliniche

Le principali associazioni ad oggi riportate sono le seguenti:

- ❖ In pazienti con adenocarcinoma sono stati confrontati i livelli circolanti di miRNA esosomiali e quelli derivanti dal tumore, identificando un pattern simile e concludendo che i primi possono essere utilizzati come biomarcatori diagnostici e prognostici per valutare l'evoluzione del tumore.
- ❖ In pazienti con cancro alla prostata correlazioni interessanti sono emerse fra i livelli del miR-141 e del miR-375 che restano stabili in circolo e rappresentano dei biomarcatori specifici di questa condizione clinica.
- ❖ In pazienti con il cancro dell'esofago a cellule squamose, i miR121 e miR1246 sembrano essere quelli con i dati più promettenti [134].

1.8.3. Esosomi come agenti terapeutici

Nel corso degli ultimi anni, sono stati sviluppati diversi approcci terapeutici a base di esosomi (ad esempio, lo sviluppo di vaccini, la terapia di rigenerazione tissutale, la somministrazione di farmaci e il silenziamento genico) e alcuni di questi sono stati testati in studi clinici di fase II. Nel primo studio clinico (fase I) condotto in Francia nel 2005, i ricercatori hanno sviluppato un vaccino contro il melanoma metastatico utilizzando gli esosomi derivati dalle cellule dendritiche (DC) autologhe (DEX). Il DEX è stato progettato con complessi peptidici funzionali del sistema MHC che possono attivare la risposta immunitaria delle cellule T, consentendo così il rigetto del tumore [131]. Dopo

la vaccinazione l'espressione proteica di NKG2D delle cellule Natural Killer (NK) e delle cellule CD8 in molti pazienti è stata ripristinata dimostrando che i DEX hanno la capacità di stimolare le cellule NK in vivo. Morse e colleghi hanno riportato un approccio clinico simile che ha impiegato l'immunoterapia DEX in pazienti con cancro polmonare a cellule non piccole avanzato (NSCLC) [134].

Gli esosomi sono stati segnalati anche per avere un potenziale terapeutico nella rigenerazione dei tessuti. Lai e colleghi, hanno dimostrato che gli esosomi derivati da cellule staminali mesenchimali (MSCs) hanno ridotto significativamente la dimensione dell'infarto in un modello murino di un danno ischemico miocardico [98]. Recentemente, gli esosomi derivati da MSC sono stati impiegati nel trattamento del graft versus host disease (GvHD) pediatrico e i risultati promettenti hanno rilanciato la potenzialità di questo trattamento rispetto ad altre malattie come il diabete di tipo 1. Gli esosomi derivati da MSC sono stati anche utilizzati in modelli animali per accelerare il recupero funzionale dopo ictus e con lesioni cerebrali, che potrebbero essere spiegati con una migliore neurogenesi e angiogenesi post-terapia. Oltre alle proteine e ai miRNA, gli esosomi possono essere ingegnerizzati per esprimere un piccolo RNA interferente (siRNA). siRNA sintetici possono essere introdotti nelle cellule per attivare interferenza dell' RNA che può silenziare un gene. Così, un esosoma ingegnerizzato con siRNA, può essere usato terapeuticamente per silenziare i geni specifici della malattia, come evidenziato da uno studio in cui il gene tumorale è stato messo fuori uso in vitro utilizzando siRNA esosomiale [134].

1.9. L'isolamento degli esosomi

Dalla scoperta degli esosomi, diverse tecniche sono state messe a punto per isolare gli esosomi dai fluidi corporei. Queste tecniche comprendono la centrifugazione a densità differenziata, l'ultrafiltrazione, la separazione immunologica e i kit di isolamento commerciali.

1.9.1. Centrifugazione differenziale e centrifugazione su gradiente di densità

Le tecniche basate sulla centrifugazione sono considerate il gold standard per l'isolamento dell'esosoma. Questi metodi non richiedono competenza tecnica o complicati pretrattamenti del campione. Grazie a queste caratteristiche, l'ultracentrifugazione è stata il metodo più comunemente usato per estrarre le vescicole di piccole dimensioni da mezzi di coltura cellulare e fluidi corporei. Ci sono due tipi di ultracentrifugazione: centrifugazione differenziale e l'ultracentrifugazione a gradiente di densità. La centrifugazione differenziale richiede di solito diversi step, fra cui una centrifugazione a bassa velocità ($300 \times g$ per 10-15 min) necessaria per rimuovere le cellule e detriti apoptotici, seguita da delle centrifugate ad alta velocità ($100\,000 \times g$) per eliminare le vescicole più grandi e per precipitare gli esosomi. Queste diverse fasi di centrifugazione vengono eseguite perché la sedimentazione si basa completamente sulla densità delle vescicole e la distanza che gli esosomi o le vescicole possono percorrere. Per questo motivo le vescicole di piccole dimensioni saranno pellettate sul fondo del tubo, mentre le particelle più grandi saranno allocate nella parte superiore del tubo. Basandosi sulla densità delle varie particelle

è possibile la coprecipitazione di proteine e corpi apoptotici, riducendo così la purezza del campione e la contaminazione degli esosomi con altre particelle. Una possibile soluzione è rappresentato da vari step di risospensione e conseguente centrifugazione dei vari pellet, sospesi in una soluzione tampone (PBS) per rimuovere alcune di queste impurità. Tuttavia questo stratagemma, da solo, non può garantire una separazione assoluta. Una delle migliori alternative potrebbe essere l'uso di un gradiente di densità di saccarosio abbinato alla centrifugazione. Questo metodo si basa sulla separazione delle vescicole a seconda della loro diversa densità di galleggiamento, che alla fine permette alle vescicole di galleggiare verso l'alto in un gradiente di saccarosio. Pertanto questo metodo permette alle proteine o alle impurità di essere pellettate sul fondo del tubo in modo da essere facilmente rimosse, ottenendo così la separazione senza aggregati degli esosomi [134].

1.9.2. Filtrazione

Le tecniche basate sulla filtrazione sono state recentemente introdotte per isolare gli esosomi. Anche se la filtrazione è stata introdotta come metodo indipendente, è attualmente utilizzata in combinazione con l'ultracentrifugazione per sostituire le prime due centrifughe del protocollo di centrifugazione differenziale. Il principio fondamentale dell'ultrafiltrazione è quello di separare le particelle a seconda delle loro dimensioni e del loro peso molecolare [134]. Così, la filtrazione può eliminare le cellule morte e i detriti di grandi dimensioni, mentre la fase di ultracentrifugazione fornisce un'ulteriore purificazione dei campioni filtrati. Anche se rispetto all'ultracentrifugazione il metodo di filtrazione è relativamente più semplice e veloce e non richiede attrezzature specializzate, potrebbe essere viziato ugualmente dalla perdita di esosomi a causa del loro intrappolamento nei pori dei filtri. Inoltre, la forza applicata per far passare il campione attraverso le membrane del filtro può provocare il danneggiamento, la deformazione e la rottura delle vescicole [134].

1.9.3. La separazione immunomagnetica

Numerosi studi proteomici della composizione molecolare degli esosomi hanno rivelato la presenza di varie proteine sulla membrana esosomiale. Queste proteine possono essere i marcatori ideali per l'immunoisolamento degli esosomi a causa dell'immunoaffinità tra le proteine (antigeni) e gli anticorpi. I recenti progressi nel campo dell'isolamento esosomiale hanno dimostrato che le sfere magnetiche rivestite dall'anticorpo possono essere efficacemente impiegate per isolare gli esosomi dalle cellule presentanti l'antigene. A questo proposito, la scelta di un corretto marcatore di membrana esosomiale è una delle fasi più importanti di questi saggi immunoenzimatici. È stato dimostrato che alcuni membri della famiglia delle tetraspanine, come il CD81, CD9, e CD63, presenti sulle membrane degli esosomi possono essere utilizzati per un'efficiente isolamento. A differenza di altre tecniche convenzionali per l'isolamento esosomiale, la separazione immunologica può essere utilizzata per l'isolamento diretto dell'esosoma da fluidi corporei, riducendo il dispendioso tempo di centrifugazione. Il vantaggio di questa tecnica di isolamento è l'alta specificità associata all'uso dell'anticorpo, sebbene questa elevata selettività e specificità possono culminare in una bassa resa esosomiale rispetto ai metodi basati sulla

separazione fisica. Recentemente è stato descritto un altro metodo immunologico, basato su una nanosonda lipidica utilizzata per isolare gli esosomi da surnatante di coltura cellulare e dal plasma sanguigno. In questa tecnica il doppio strato lipidico di esosomi viene marcato con biotina coniugata ad un composto simile al polietilenglicole. Successivamente le vescicole etichettate sono state raccolte su particelle magnetiche submicrometriche rivestite di NeutrAvidina per la successiva estrazione e analisi del carico esosomiale. Seppur efficace questo approccio è limitato dai costi per l'acquisto delle varie composizioni antigene-anticorpo e dalle successive procedure di isolamento del contenuto delle nanovesicole. Un altro problema considerevole è l'uso di buffer di eluzione, necessari per liberare gli esosomi dagli immunocomplessi. Condizioni sfavorevoli ad esempio, l'alterazione del pH, la presenza di detergenti e agenti riducenti nel tampone possono influire sulla funzionalità esosomiale attraverso la distruzione della permeabilità della membrana. Per questi motivi, la separazione immunologica non è adatta all'analisi su larga scala degli esosomi [134].

1.9.4. L'isolamento degli esosomi mediante kit commerciali

I metodi di precipitazione a base di polimeri prevedono solitamente la miscelazione dei fluidi biologici di interesse con una soluzione polimerica a concentrazione di sale ottimizzata seguita da un'incubazione notturna a 4 °C. Gli esosomi così precipitati sono recuperati mediante centrifugazione a bassa velocità e risospesi in PBS per le successive applicazioni. Il polimero più comunemente utilizzato per questo approccio è il polietilenglicole (PEG). Questo metodo è stato regolarmente utilizzato per la precipitazione di varie biomolecole, virus e altre piccole particelle [134]. I kit di isolamento disponibili in commercio usano PEG per isolare anche gli esosomi da mezzi di coltura cellulare e fluidi corporei. Diversi studi indicano che i kit di isolamento commerciale forniscono una metodologia semplice per l'efficiente isolamento degli esosomi da campioni clinici, evitando la necessità di lunghe fasi di centrifugazione e precipitazione utilizzate nelle tecnologie di isolamento convenzionali. Questi kit sono anche compatibili per il dosaggio di esosomi in fluidi corporei, quali siero, plasma, urina, liquido cerebrospinale e mezzi di coltura. Uno studio comparativo ha riferito che i kit commerciali erano più efficienti nell'isolamento degli esosomi da campioni urinari rispetto all'ultracentrifugazione. Anche se i kit di isolamento esosomiale offrono molti vantaggi, come la necessità di un piccolo volume del campione, la semplicità e il rapporto costo-efficacia, essi sono limitati dalla loro bassa specificità dovuta alla coisolamento di altro materiale. Oltre a questi contaminanti, i campioni precipitati contengono molecole di polimeri, che non sono adatti a tutte le metodiche di rilevazione/quantificazione.

La Tabella 4 riassume le principali caratteristiche delle varie metodiche descritte con i relativi vantaggi e svantaggi [134].

Isolation method	Working principle	Advantages	Disadvantages	Reference
Differential centrifugation	The method consists of multiple centrifugation steps to exclude large vesicles and cells debris and precipitate exosomes.	Considered to be a gold standard and reliable method. Allowing the analysis of large sample volumes and multiple samples at the same time.	Time-consuming procedures, high equipment cost, high centrifugation speed resulting in exosome damage.	[9,27,159]
Density gradient centrifugation	Combination of ultracentrifugation with sucrose density gradient.	The method separates low-density exosomes from other extracellular vesicles.	Very high sensitivity to the centrifugation time.	[27,29,160]
Filtration	Ultrafiltration membranes are used to separate exosomes from other vesicles due to size differences.	Filtration allows the separation of big particles from exosomes. During the process, the exosomal population is concentrated by the filtration membrane.	Trapping of exosomes in the pores of the filters and attaching vesicles to the membranes, leading to the loss of exosomes. Additionally, the force applied to pass the sample through the membranes may result in the damage, deformation, and breaking up of large vesicles.	[161–163]
Immunological separation	Exosomes are captured due to interactions between antigens on the exosome surface and prefuctionalized magnetic beads coated with antibodies.	The method isolates exosomes directly from cell culture supernatant or bodily fluids.	The method cannot be applied to large-volume samples.	[169–171]
Polymer-based precipitation	The technique includes mixing of the biological fluid with a polymer-containing precipitation solution, followed by an incubation step and centrifugation at low speed.	Easy to use, does not require specialized equipment, large and scalable sample capacity.	Polymer-based precipitation methods co-isolate nonexosomal contaminants.	[177]

Tabella 4 - Confronto fra le varie tecniche di isolamento esosomiale

1.10. Le sfide dell'analisi esosomiale e le possibili soluzioni

Il problema principale nell'applicazione clinica degli esosomi è la mancanza di metodi specifici e riproducibili per isolare e individuare una popolazione specifica di esosomi (ad esempio, tumore-derivati) tra gli altri esosomi non specifici ed fra le altre EV presenti nel circolo. A causa del crescente interesse per gli esosomi, c'è l'urgente necessità di uno strumento affidabile per l'isolamento di esosomi specifici e l'aspetto più complicato risiede nelle tecniche di rilevazione successive all'isolamento di queste NV.

1.10.1. Sfide tecniche

È stato osservato che le diverse fasi preanalitiche, come il prelievo del campione, la conservazione, l'uso di anticoagulanti e il tempo di processamento del campione, possono influire in modo significativo sia nell'isolamento che nella rilevazione esosomiale. Per superare questo problema, l'analisi dovrebbe essere condotta con strumenti regolarmente calibrati. In quest'ottica la Società Internazionale per le vescicole extracellulari ha palesato la necessità di redigere una serie di linee guida standardizzate per la creazione di una piattaforma di dati uniforme [134].

Ad oggi, 3 sono i momenti critici documentati nella gestione del campione:

- ❖ La procedura di raccolta del campione. Durante il prelievo le vescicole dovute all'attivazione piastrinica rappresentano un'impurità difficile da distinguere dagli esosomi circolanti.
- ❖ Il tipo di provetta che contiene il campione. L'utilizzo di anticoagulanti come l'eparina rappresentano un problema poiché l'eparina compete con i primers e con gli enzimi che

legano gli acidi nucleici, provocando dei falsi negativi nelle analisi di PCR che inficiano l'associazione di determinati acidi nucleici agli esosomi e alle altre EVs.

- ❖ Le condizioni di conservazione del campione. Molto spesso la discrepanza nelle analisi è dovuta a un'inappropriata conservazione del campione. Di solito per gli studi con casistiche molto ampie si tende a congelare i campioni prima di effettuare le analisi, ma questo approccio potrebbe inficiare la quantificazione delle NV stesse. È infatti raccomandato processare il campione fresco per collezionare correttamente gli esosomi [134].

1.10.2. Sfide biologiche

Molti fattori genetici, fisiologici e ambientali che sono associati con l'eterogeneità del campione possono influenzare l'analisi dell'esosoma. Anche in individui sani, gli esosomi specifici della malattia possono essere presenti in quantità maggiori o minori del normale a causa di diversi fattori come l'età, il sesso, l'indice di massa corporea (BMI) e l'immunità, che variano da persona a persona. Quindi, scegliere dei controlli ideali per una grande coorte di campioni eterogenei è una sfida significativa. Ad esempio esosomi isolati da giovani individui non possono essere utilizzati in modo affidabile per l'analisi di esosomi che derivano da persone anziane. Per studiare gli effetti dell'eterogeneità del campione sulla biogenesi, la funzionalità e la quantità di esosomi sono necessari molti studi sistemici, che per adesso mancano in letteratura. Inoltre anche se i recenti progressi hanno migliorato l'efficienza dell'isolamento degli esosomi dalle altre vescicole extracellulari, ci sono solo poche strategie riportate che descrivono la rilevazione efficiente di esosomi specifici della malattia rispetto a quelli normalmente presenti nello stesso soggetto.

Nonostante i progressi descritti nelle strategie di rilevazione e conseguente caratterizzazione del carico esosomiale, sia per fini di ricerca sia clinici, l'isolamento di routine e la quantificazione degli esosomi sono ancora una realtà impegnativa e onerosa, in parte a causa della mancanza di rapide, sensibili e riproducibili metodologie a basso costo [134].

1.11. Biomarcatori di malattie renali negli esosomi

Gli esosomi urinari rappresentano un esempio di campione non invasivo per la scoperta di biomarkers relativi ad una varietà di processi renali. Molti studi hanno focalizzato l'attenzione sul significato patologico e fisiopatologico degli esosomi urinari, portando all'identificazione di alcune proteine con potenziale valore diagnostico. Non è chiaro, inoltre, se e in quale misura gli esosomi presenti in circolo contribuiscano alla composizione del proteoma urinario. Tramite nanospray/full LC-tandem MS (liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry) è stato possibile identificare negli esosomi urinari proteine di tutte le diverse porzioni del nefrone:

- ❖ proteine dei podociti glomerulari (podocina e podocalixina);
- ❖ proteine delle cellule epiteliali del tubulo prossimale (APN, AQP1, megalina, cubilina, anidrasi carbonica IV);
- ❖ proteine del tratto ascendente dell'ansa di Henle (THP, CD9 e il cotrasportatore Na-K-2Cl);
- ❖ proteine del tubulo convoluto distale (NCC) e del dotto collettore (AQP-2, mucina-1)(22).

Nel complesso, lo studio di Pisitkun e collaboratori, ha identificato 295 proteine, incluse alcune già note per essere responsabili di malattie renali e sistemiche, quali ad esempio la policistina-1 (per il rene policistico autosomico dominante), la proteina NCCT (coinvolta nella sindrome di Gitelman), il cotrasportatore NKCC2 (nella sindrome di Bartter di tipo I), la proteina FXYD (nell'ipomagnesemia renale familiare), la proteina AQP-2 (per il diabete insipido tipo-I nefrogenico autosomico dominante/recessivo), i canali epiteliali del Na⁺ (per lo pseudoipoadosteronismo di tipo-1 autosomico recessivo), l'anidrasi carbonica IV (nell'acidosi del tubulo renale prossimale), l'uromodulina (per la malattia cistica della midollare), le aminopeptidasi A e P (per l'ipertensione). L'identificazione di tali proteine suggerisce la possibilità di utilizzare gli esosomi come fonte di informazione sullo stato fisiopatologico dell'intero tubulo renale.

2. Scopo del lavoro

Lo scopo primario di questo progetto è stato quello di isolare le NV contenute all'interno del siero e delle urine in pazienti sottoposti a trapianto renale con i relativi donatori, campionati ove possibile.

La successiva caratterizzazione dei genomi virali liberi o eventualmente contenuti all'interno delle NV è stata eseguita mediante la messa a punto di un protocollo di spettrometria di massa MALDI-TOF. Tale procedura ha permesso di rilevare la contemporanea presenza o assenza di 34 genomi virali appartenenti alle famiglie dei Polyomavirus e Papillomavirus umani.

Per determinare quale fosse l'esatta collocazione dei genomi virali isolati, il frazionamento degli esosomi è stato condotto con due metodiche differenti messe a confronto.

Infine, a saggio messo a punto, è stata analizzata la percentuale delle positività dei genomi virali nel tempo prendendo in considerazione per ciascun soggetto reclutato, l'anno successivo al trapianto.

3. Materiali e Metodi

3.1. Descrizione della casistica

Lo studio ha reclutato 72 pazienti sottoposti a trapianto renale tra Novembre 2015 e Gennaio 2017 presso l'Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto del Policlinico S.Orsola-Malpighi, diretta dal prof. G. La Manna. Nello specifico 15 pazienti hanno effettuato trapianto da donatore vivente campionati con i rispettivi donatori e 57 pazienti da donatore deceduto. Lo studio ha ricevuto l'autorizzazione da parte del Comitato Etico (numero 133/2015/U/Sper) del Policlinico e ciascun paziente è stato reclutato previo consenso informato. Ciascun soggetto è stato sottoposto a prelievi di sangue e urine (quando presenti) secondo il timing riassunto in Tabella 5 e quindi il giorno prima del trapianto (T0), entro un mese dal trapianto (T1), a 3 mesi (T2), a 6 mesi (T3) e a un anno (T4) dal trapianto.

Timing dei prelievi	
T0	Pre-Tx
T1	1 mese dal Tx
T2	3 mesi dal Tx
T3	6 mesi dal Tx
T4	12 mesi dal Tx

Tabella 5 - Timing dei prelievi. Tx: trapianto

Abbiamo escluso dall'analisi di genotipizzazione, 9 (CAD5, CAD11, CAD12, CAD18, CAD24, CAD48, CAD53, CAD57 e RIC6) dei 72 soggetti sottoposti a trapianto per diverse ragioni fra cui:

- ❖ Decesso del paziente (CAD5, CAD11 e CAD12);
- ❖ Revoca del consenso (CAD57, DON13 e RIC6);
- ❖ Complicazioni post operatorie che hanno reso impossibile effettuare i prelievi di follow up secondo il timing stabilito (CAD18, CAD24, CAD48 e CAD53).

A seguito della revoca del consenso per il donatore della coppia 13, il suo ricevente è stato incluso nel gruppo di analisi dei riceventi trapiantati privi di informazioni sul donatore, ovvero deceduti.

I campioni dei pazienti reclutati sono stati processati da fresco senza anteporre steps di congelamento, previa anonimizzazione dei dati sensibili del paziente mediante assegnazione di codice alfanumerico univoco e aggiunto nel database informatico protetto da password, in cui sono stati collezionati i dati.

3.2. Isolamento degli esosomi da campioni di siero

Il prelievo sanguigno è stato processato seguendo gli step riportati di seguito:

- ❖ Centrifuga a 1000 rcf per 10 minuti a 4°C per separare la frazione sierica e conseguente trasferimento del surnatante in una nuova provetta.
- ❖ Centrifuga a 2000 rcf per 30 minuti a 4°C e conseguente trasferimento del surnatante in una nuova eppendorf.
- ❖ A 500µl di siero centrifugato aggiungere 100 µl del reagente specifico per l'isolamento degli esosomi da siero del kit Total exosome isolation from serum (Life Technologies) (Figura 9).
- ❖ Incubare per un'ora a 4°C.
- ❖ Centrifuga a 10000 rpm per dieci minuti.
- ❖ Aspirare il surnatante
- ❖ Risospendere il pellet in 100 µl di PBS 1X
- ❖ Stoccare il campione a – 20 °C.



Figura 9 - Total Exosome Isolation from serum (Life Technologies)

3.3. Isolamento degli esosomi da campioni di urine

Il protocollo per le urine differisce di poco da quello del siero e sono stati effettuati i passaggi descritti:

- ❖ Centrifuga a 2000 rcf per 30 minuti a 4°C e conseguente trasferimento del surnatante in una nuova eppendorf.
- ❖ A 1ml di siero centrifugato aggiungere 1ml del reagente specifico per l'isolamento degli esosomi da urine del kit Total exosome isolation from urine (Life Technologies) (Figura 10).
- ❖ A seguire gli stessi step descritti per il siero.



Figura 10 - Total exosome isolation from urine (Life Technologies)

3.4. Nanoparticle tracking analysis

La tecnica del Nanoparticle tracking analysis (NTA) permette di ottenere le dimensioni medie e la concentrazione di particelle in sospensione in un liquido valutando il light-scatter delle particelle colpite da una fonte luminosa, ovvero la diffusione ottica o dispersione (scattering) della luce (Figura 11). Particelle particolarmente piccole, nanometriche, si muovono in una sospensione in tutte le direzioni, con un moto definito Browniano, ovvero un moto continuo, rapido e irregolare. Lo scattering emesso da particelle con queste caratteristiche è rilevato e valutando il loro spostamento nel tempo, tramite l'applicazione dell'equazione di Stokes-Einstein, si calcola la distribuzione delle dimensioni delle particelle. Il dispositivo utilizzato per le analisi NTA è costituito da un laser, un microscopio con sensori CCD o CMOS, una pompa idraulica e una camera di misurazione. La pompa idraulica inietta le particelle in sospensione del campione nella camera di misurazione con una velocità di flusso costante (fixed flow rate), mettendole in movimento. Le particelle in movimento sono esposte al raggio laser e i movimenti delle particelle illuminate sono registrati dalla camera del microscopio.

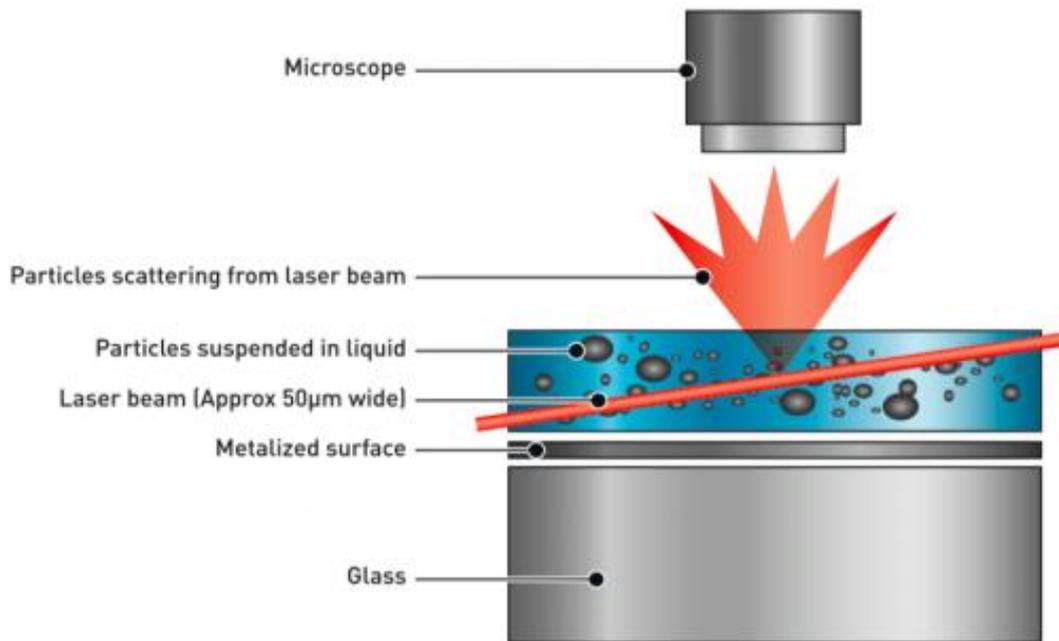


Figura 11 – Nanoparticle Tracking Analysis

Mediante l'interpretazione dei video registrati, un software dedicato analizza i dati di scattering delle particelle e fornisce come risultato finale le dimensioni medie e la loro concentrazione. I molteplici vantaggi di questa tecnica sono rappresentati da:

- ❖ Poter rilevare le particelle a partire dai 30nm;
- ❖ Eseguire le analisi in fase liquida non turbando le condizioni ambientali delle nano vescicole;
- ❖ Possibilità di recuperare il campione nella sua forma nativa

Tuttavia, non permette di discriminare gli esosomi singoli da microvescicole e/o da aggregati di vescicole o proteici e necessita di opportune prove per individuare il fattore di diluizione giusto al fine di registrare tutte le vescicole presenti, ed evitare che le vescicole di dimensioni maggiori nascondano quelle di dimensioni minori.

Gli esosomi ottenuti sono stati analizzati utilizzando il sistema di caratterizzazione delle nanoparticelle NS500 (Nanosight Malvern Instruments).

3.5. MACSplex exosome isolation kit

Il MACSplex exosome isolation kit è un kit commerciale per la caratterizzazione degli esosomi sviluppato dalla Miltenyi Biotec GmbH. Il kit comprende 39 popolazioni di biglie (MACSplex Exosome Capture Beads) distinguibili tramite analisi al citofluorimetro. Ogni popolazione è marcata con quantità specifiche di due molecole fluorescenti, il FITC e il PE. Questa marcatura

permette di discriminare fra loro tutte le popolazioni di biglie, dato che l'intensità di colorazione nelle due fluorescenze è diversa per ogni set di biglie. Mediante un'analisi bi-parametrica FITC versus PE, le popolazioni di biglie si possono rilevare e distinguere su una matrice di intensità di fluorescenza (Figura 12).

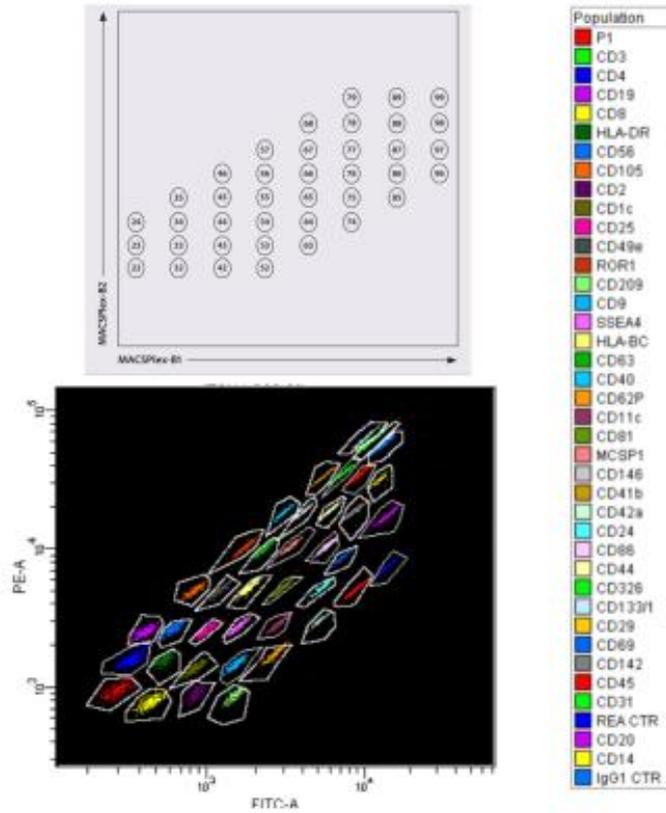


Figura 12 – MACSplex Exosome kit: elenco marcatori di superficie rilevati in fluorescenza

Delle 39 popolazioni di biglie, 37 popolazioni sono rivestite da uno specifico anticorpo diretto verso un particolare antigene potenzialmente presente sulla superficie esosomiale.

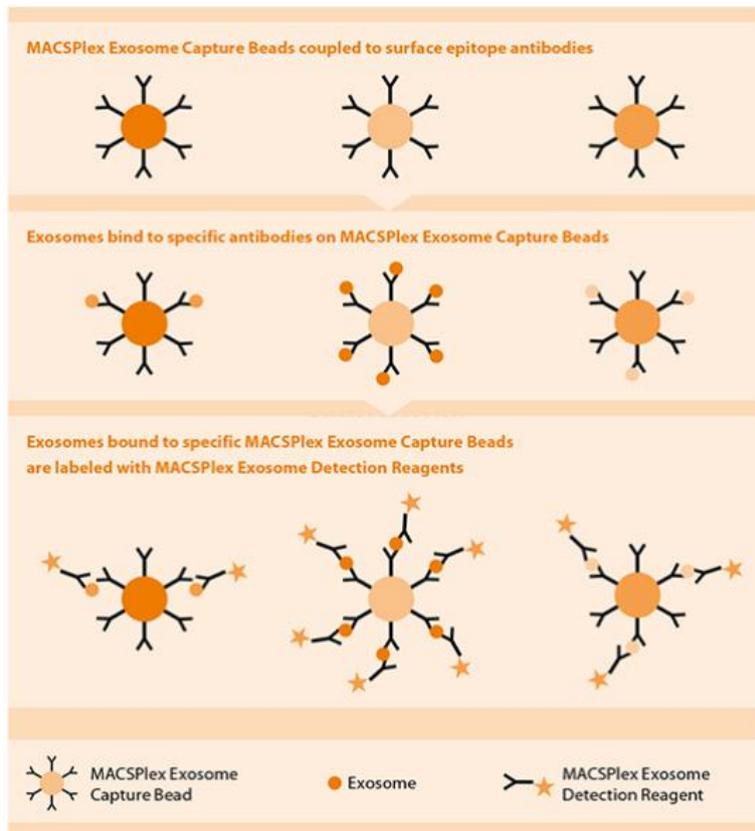


Figura 13 – Principio di funzionamento della metodica

Una volta che gli esosomi esprimenti quel particolare epitopo si legano alla rispettiva biglia, sono rilevati mediante un cocktail di anticorpi di rilevazione. Il cocktail di rilevazione comprende l'anti CD-9, l'anti CD-63 e l'anti CD-81 coniugati con APC. Questo ultimo passaggio di marcatura permette l'identificazione, nel canale di rilevazione dell'APC, del complesso biglia-esosoma-anticorpo-di-rilevazione, indicando simultaneamente la presenza di esosomi positivi per almeno uno dei tre antigeni di rilevazione (CD-9, CD-63 e CD-81) e per il marcatore specifico legato dalla biglia. È possibile quindi, attraverso un'analisi al citofluorimetro, distinguere le varie popolazioni di esosomi esprimenti specifici antigeni di superficie. Due popolazioni di biglie, REA control e mIgG1 control, sono invece rivestite da anticorpi non presenti sugli esosomi e servono da controlli negativi isotipici. I campioni sono stati analizzati utilizzando il citofluorimetro BD FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, Stati Uniti), registrando un minimo di 50 eventi per ogni popolazione di biglie specifiche per i vari antigeni (Figura 13).

3.6. Trattamento con la DNAsi

I 100ul di esosomi isolati sono stati splittati in 2 aliquote distinte da 50 ul ciascuna. Una delle due è stata trattata enzimaticamente per confrontare le eventuali differenze fra il campione trattato e quello non trattato. L'utilizzo del trattamento dovrebbe verosimilmente digerire il DNA esterno

agli esosomi agendo sia sul singolo sia sul DNA a doppio filamento presente nel campione. Il trattamento viene eseguito seguendo le specifiche del kit DNase I, RNase-free (Catalog number: en0521- Thermo Scientific™) (Figura 14).



Figura 14 - Dnase I

3.7. Estrazione e normalizzazione del DNA virale

L'estrazione del DNA virale è stata effettuata utilizzando il kit Nucleospin tissue (Macherey Nagel)(Figura 15) secondo le specifiche del protocollo per l'isolamento del DNA virale. L'eluizione finale è stata ottimizzata in 30ul di volume finale per concentrare al massimo la quota di DNA isolata.



Figura 15 - NucleoSpin Tissue

La quantificazione del DNA estratto è stata effettuata mediante lo strumento NanoDrop 3.0.0 (Celbio S.P.A, Milano, Italia) utilizzando 1µl di campione. Il NanoDrop, sfrutta una tecnologia basata sulla tensione superficiale che piccoli volumi di liquidi esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine, in tal modo una goccia di campione, posizionata sull'apposita piastra di lettura, crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche, e può essere analizzata in modo semplice e veloce. Un rapporto tra la densità ottica a 260 nm e 280 nm maggiore o uguale a 1.8 , indica che l'estrazione del DNA è stata ben eseguita poiché vi è un buon rapporto tra DNA estratto e proteine che lo accompagnano. Un altro indice di purezza del campione è il rapporto tra le densità ottiche 260 e 230, che deve essere compreso tra 1.8 e 2.2.



Figura 16 - NanoDrop 3.0.0

3.8. Allestimento delle piastre da lavoro

Tutti i campioni estratti sono stati aliquotati in piastre da 96 pozzetti. Ogni 4 piastre da 96 si allestisce una piastra da 384 campioni che sarà quella oggetto dell'esperimento. Nella Figura 17 sottostante è rappresentato un esempio di piastra da 384 pozzetti contenente i campioni, i controlli positivi (evidenziati in azzurro), i controlli negativi (evidenziati in arancione). I controlli negativi sono costituiti da H₂O MilliQ e sono sottoposti allo stesso protocollo sperimentale dei campioni per verificare la presenza di eventuali addotti aspecifici o falsi positivi. Il controllo positivo è rappresentato da un campione di DNA commercializzato, che fa parte del pannello delle famiglie CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain). Questo controllo si aggiunge per monitorare l'amplificazione effettuata con lo step di PCR. Per l'esecuzione di questo lavoro abbiamo preparato 22 piastre da 96 campioni ciascuna. In ogni chip abbiamo inserito dei replicati di campioni già screenati per poter rianalizzare dei campioni verificando la ripetibilità del metodo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	530_DO	590_DO	611_DO	635_DO	660_DO	686_DO	710_DO	734_DO	530_DO	590_DO	611_DO	635_DO	660_DO	686_DO	710_DO	734_DO	530_DO	590_DO	611_DO	635_DO	660_DO	686_DO	710_DO	734_DO
B	555_DO	601_DO	624_DO	648_DO	669_DO	699_DO	721_DO	747_DO	555_DO	601_DO	624_DO	648_DO	669_DO	699_DO	721_DO	747_DO	555_DO	601_DO	624_DO	648_DO	669_DO	699_DO	721_DO	747_DO
C	532_DO	591_DO	613_DO	639_DO	661_DO	689_DO	711_DO	738_DO	532_DO	591_DO	613_DO	639_DO	661_DO	689_DO	711_DO	738_DO	532_DO	591_DO	613_DO	639_DO	661_DO	689_DO	711_DO	738_DO
D	560_DO	603_DO	625_DO	650_DO	673_DO	700_DO	722_DO	748_DO	560_DO	603_DO	625_DO	650_DO	673_DO	700_DO	722_DO	748_DO	560_DO	603_DO	625_DO	650_DO	673_DO	700_DO	722_DO	748_DO
E	533_DO	592_DO	614_DO	640_DO	662_DO	692_DO	712_DO	739_DO	533_DO	592_DO	614_DO	640_DO	662_DO	692_DO	712_DO	739_DO	533_DO	592_DO	614_DO	640_DO	662_DO	692_DO	712_DO	739_DO
F	562_DO	604_DO	626_DO	651_DO	676_DO	701_DO	725_DO	750_DO	562_DO	604_DO	626_DO	651_DO	676_DO	701_DO	725_DO	750_DO	562_DO	604_DO	626_DO	651_DO	676_DO	701_DO	725_DO	750_DO
G	535_DO	594_DO	615_DO	641_DO	663_DO	693_DO	713_DO	740_DO	535_DO	594_DO	615_DO	641_DO	663_DO	693_DO	713_DO	740_DO	535_DO	594_DO	615_DO	641_DO	663_DO	693_DO	713_DO	740_DO
H	566_DO	605_DO	627_DO	652_DO	677_DO	702_DO	726_DO	753_DO	566_DO	605_DO	627_DO	652_DO	677_DO	702_DO	726_DO	753_DO	566_DO	605_DO	627_DO	652_DO	677_DO	702_DO	726_DO	753_DO
I	536_DO	595_DO	616_DO	642_DO	664_DO	695_DO	715_DO	741_DO	536_DO	595_DO	616_DO	642_DO	664_DO	695_DO	715_DO	741_DO	536_DO	595_DO	616_DO	642_DO	664_DO	695_DO	715_DO	741_DO
J	571_DO	606_DO	628_DO	653_DO	680_DO	703_DO	728_DO	754_DO	571_DO	606_DO	628_DO	653_DO	680_DO	703_DO	728_DO	754_DO	571_DO	606_DO	628_DO	653_DO	680_DO	703_DO	728_DO	754_DO
K	540_DO	596_DO	620_DO	643_DO	665_DO	696_DO	716_DO	742_DO	540_DO	596_DO	620_DO	643_DO	665_DO	696_DO	716_DO	742_DO	540_DO	596_DO	620_DO	643_DO	665_DO	696_DO	716_DO	742_DO
L	573_DO	608_DO	631_DO	655_DO	681_DO	706_DO	730_DO	757_DO	573_DO	608_DO	631_DO	655_DO	681_DO	706_DO	730_DO	757_DO	573_DO	608_DO	631_DO	655_DO	681_DO	706_DO	730_DO	757_DO
M	544_DO	597_DO	621_DO	646_DO	666_DO	697_DO	717_DO	744_DO	544_DO	597_DO	621_DO	646_DO	666_DO	697_DO	717_DO	744_DO	544_DO	597_DO	621_DO	646_DO	666_DO	697_DO	717_DO	744_DO
N	583_DO	609_DO	632_DO	658_DO	684_DO	708_DO	731_DO	POS_DO	583_DO	609_DO	632_DO	658_DO	684_DO	708_DO	731_DO	POS_DO	583_DO	609_DO	632_DO	658_DO	684_DO	708_DO	731_DO	POS_DO
O	551_DO	600_DO	622_DO	647_DO	668_DO	698_DO	719_DO	745_DO	551_DO	600_DO	622_DO	647_DO	668_DO	698_DO	719_DO	745_DO	551_DO	600_DO	622_DO	647_DO	668_DO	698_DO	719_DO	745_DO
P	588_DO	610_DO	634_DO	659_DO	685_DO	709_DO	733_DO	NEG_DO	588_DO	610_DO	634_DO	659_DO	685_DO	709_DO	733_DO	NEG_DO	588_DO	610_DO	634_DO	659_DO	685_DO	709_DO	733_DO	NEG_DO

Figura 17 - Esempio di progettazione di una piastra da 384 pozzetti

3.9. Genotyping mediante MALDI TOF

3.9.1. Selezione dei virus candidati, disegno dei primers e “dummy allele”

Per questo studio sono stati selezionati 18 poliomavirus (PyVs) e 16 papillomavirus umani (HPVs). La selezione ha incluso alcuni dei virus associati da letteratura a pazienti trapiantati di rene (PyVs) e alcuni virus contratti facilmente per via sessuale e ad alto rischio oncogeno (HPVs). I singoli genotipi analizzati sono riassunti nella Tabella 6 e nella Tabella 7.

Polyomavirus		
rs1	BPyV3	Bovine polyomavirus 3
rs2	BPyV1	Bovine polyomavirus 1
rs3	BPyV2	Bovine polyomavirus 2
rs4	MPyV	Murine polyomavirus
rs5	EPyV	Equine polyomavirus
rs6	BKV	B.K. Polyomavirus
rs7	JCV	J.C. polyomavirus
rs8	MWPyV	Malawi polyomavirus
rs9	MPyV	Merkel cell polyomavirus
rs10	HPyV6	Human polyomavirus 6
rs11	HPyV7	Human polyomavirus 7
rs12	TPyV	Viral-associated trichodysplasia spinulosa
rs13	HPyV9	Human polyomavirus 9
rs14	WUPyV	WU polyomavirus
rs15	KIPyV	KI polyomavirus
rs16	HPyV12	Human polyomavirus 12
rs17	SV12	Simian Virus (or agent) 12
rs18	SV40	Simian Virus 40

Tabella 6 - Genotipi virali dei PyVs testati

Papillomavirus		
53	HPV 53	Human Papillomavirus 53
66	HPV 66	Human Papillomavirus 66
39	HPV 39	Human Papillomavirus 39
16	HPV16	Human Papillomavirus 16
58	HPV 58	Human Papillomavirus 58
73	HPV 73	Human Papillomavirus 73
45	HPV 45	Human Papillomavirus 45
59	HPV 59	Human Papillomavirus 59
56	HPV 56	Human Papillomavirus 56
68	HPV 68	Human Papillomavirus 68
18	HPV 18	Human Papillomavirus 18
33	HPV 33	Human Papillomavirus 33
31	HPV 31	Human Papillomavirus 31
51	HPV 51	Human Papillomavirus 51
52	HPV 52	Human Papillomavirus 52
35	HPV 35	Human Papillomavirus 35

Tabella 7 - Genotipi virali HPV testati

Per la scelta dei primers, si è intervenuti su regioni specifiche dei genotipi virali (Large T Antigen) e si è scelta una base a caso dando origine ad un “Allele Dummy” sfruttando così la capacità dello strumento di discriminare un allele piuttosto che un altro. L’“Allele Dummy” è stato pertanto generato arbitrariamente dall’operatore, previa verifica dell’assenza di isolati genetici associati a quella posizione per quel genotipo virale. Durante l’analisi quindi, quando il Detector ha identificato l’ “Allele Dummy” inesistente in realtà, stavamo guardando un campione negativo, viceversa la chiamata “wild type” corrisponde alla reale presenza del virus nel campione. Il disegno dei primers è stato effettuato utilizzando il software online dedicato chiamato Assay Design v.4.0 (<https://www.mysequenom.co>, Sequenom Inc., San Diego, CA, USA), che comprende differenti sezioni:

The screenshot shows the software interface with a blue header bar containing 'Main Menu'. Below it, a list of tools is displayed: 'rs Sequence Retriever - from NCBI dbSNP', 'ProxSNP - Sequence Mapping/Proximal SNP Demarkation', 'PreXTEND - SNP Validation/Amplicon Design', 'Assay Design - Multiplexed hME Assay Design', and 'PleXTEND - Multiplexed Assay Validation'. To the right, under the heading 'Genotyping Tools', there are four instances of the text 'Existing Results'.

❖ *Sequence Retriever*

Inserendo il numero identificativo di ogni genotipo virale oggetto di interesse in NCBI è stata recuperata la sequenza del genoma e le regioni fiancheggianti il polimorfismo scelto come “Dummy Allele”;

❖ *ProxSNP*

Quando si è scelto il “Dummy Allele”, si è verificato se la scelta generava un isolato genetico che poteva compromettere la valutazione dell’analisi. Inoltre abbiamo esteso il controllo anche alle sequenze fiancheggianti lo SNP fantoccio per assicurarci che l’*annealing* dei primers durante la fase di amplificazione non fosse ostacolato da questi eventuali isolati;

❖ *preXTEND*

Valutazione della possibilità di costruire i primers sulle sequenze precedentemente determinate. Quando possibile, esse vengono confrontate con il genoma di riferimento ed umano per garantire che leghino, e quindi amplifichino, un'unica regione. L’output ottenuto in questo caso consiste nella lista degli SNPs per i quali è possibile costruire i primers, con un indice di confidenza che ne specifica la bontà.

❖ *Assay design*

Questo programma fornisce per ogni SNP che si intende analizzare, le sequenze dei due primers di PCR, denominati rispettivamente *first* e *second*, e del primer di extension, costruito in modo tale che si leghi alla base 3’-terminale adiacente allo SNP. Nella Figura 18 sono presenti i 2 design così generati con le sequenze dei due primers di PCR, del primer di extension e la lunghezza degli ampliconi risultanti. Queste plex sono quelle con cui abbiamo screenato tutti i nostri campioni.

SNP_ID	First PCR	Second PCR	AMP_LEN	UEP_SEQ
rs45511401	ACGTTGGATGTGAGAGCAGGGACGACTTTC	ACGTTGGATGTCAGCATCACCTTCTCCATC	103	TCTCCATCCCCGAAG
rs10	ACGTTGGATGCCTCTTTTTGGAGCCTTC	ACGTTGGATGTACAAGAATCTAGGGCTGAG	84	AGGGCTGAGGGTTTA
rs28362491	ACGTTGGATGATGACTCTATCAGCGGCACT	ACGTTGGATGTAGGGAAGCCCCAGGAAG	120	GCCTGCCGGGCCAAT
rs12	ACGTTGGATGCTAACAGTGCAGTGTGTAC	ACGTTGGATGAGGAAGGGAGCATGGTATTC	108	TGACTCCTGGCAAGCAT
rs15	ACGTTGGATGAACCTCCAGGAATATTTTC	ACGTTGGATGGGTCTGTATAGTAGGATGTG	85	GGATGTGTAGACAACCA
rs2	ACGTTGGATGTTCTATGCTCAAGGCGTCTG	ACGTTGGATGGACCCCTTTATTAATGGC	114	cccCTGCACCTGAAGCAT
rs1	ACGTTGGATGTTGCACCTTGGCAACTTCC	ACGTTGGATGGTGAATTTGCCAATGTGCTG	117	TGAACAGTACAGATCCAT
rs4	ACGTTGGATGCAATGCAACGCCACCTAAG	ACGTTGGATGAGACAAATACCCAGTAAGGC	100	gAGGCTGCTAGGAAAGTCA
rs14	ACGTTGGATGGGTGTGCCTGTGAACATTG	ACGTTGGATGAAATCTCCTGGAGAAACCCC	94	ccctcAACCCCTACAAAGCG
rs3	ACGTTGGATGCAGCTGAAACTCTATGTTAG	ACGTTGGATGAGGCACAAATACAGAAGCCC	102	AGCTGGCATTCTGTTTTAA
rs8	ACGTTGGATGAGGCTGCTTAAAGGCCTATG	ACGTTGGATGCTTAAACCATGTTCTGACTC	107	ccTGTTCCTGACTCTGTTTTAA
rs5	ACGTTGGATGCTGGCTCAACCTCAAACTC	ACGTTGGATGTGGTTAGTGAGTATGCCTTG	105	gGAGTATGCCTTGGCTATTAG
rs18	ACGTTGGATGATTTGCTGACAGCAAAAACC	ACGTTGGATGATTGTAGGCTATCAACCCGC	106	CGTTTTTAGCTAAAACAGTAT
rs7	ACGTTGGATGGGAAACCAAGTGTGAGGATG	ACGTTGGATGCATTTTTGCATTGCTGTGGG	101	ggagTTGCTGTGGGTTTTCTCTG
rs6	ACGTTGGATGCCAAACCAAGGCTCTTTTC	ACGTTGGATGAAAAGCCTTCTGTGCACTG	113	ccccaTTCTGTGCACTGCCCTTG
rs17	ACGTTGGATGCATGGAAGCTTATCACAGAG	ACGTTGGATGTCTGGGTTGTGCTGAAATTC	114	gtgAGAACACATCTTCACATTTG
rs11	ACGTTGGATGTTATTATGGTAAAAGCTGTG	ACGTTGGATGCCTCCTTCTTGTACTCTCT	114	TTAGAATCTTGAAGGCCTTATAA
rs13	ACGTTGGATGGTTGCACAGTGTACTTTTAG	ACGTTGGATGCTTCAACAACCTAAAAGGG	120	ccccAAGCTCTATAAAGCTCTAAAG
rs16	ACGTTGGATGGCATGGCTATTTGTACATCC	ACGTTGGATGGCTAATAGTACATTGTTTTGC	105	ACATTGTTTTGCACAATAATTTTTAA
rs9	ACGTTGGATGTTCCACTGTTAATAGGCC	ACGTTGGATGGTTTAAAAGAAGCTGCAGA	116	GCTGCAGAAAATTATTCAATTATTA

SNP_ID	First PCR	Second PCR	AMP_LEN	UEP_SEQ
53	ACGTTGGATGTTTAGTTAGTGCTCCAGGC	ACGTTGGATGGTGTGCAAATTCTGTTTGCT	108	GCTCCAGGCTAGCCCC
66	ACGTTGGATGATAGACCAATTTGCTGGAGCG	ACGTTGGATGCACCACCAACTCACACTTAC	85	CCACAGCAAGCTAGACA
39	ACGTTGGATGAGCAGGAAGCTATACAGGAC	ACGTTGGATGGGTTTCTCTCGTGTAGTC	114	TGGACCACAAAACGGGA
16	ACGTTGGATGAGCATATGGATTCCCATCTC	ACGTTGGATGATGTGTACTGCAAGCAAC	117	cAGTCATATACCTCACGTC
58	ACGTTGGATGAGGTCAGTTGGTTCAAGGATG	ACGTTGGATGACCTGTAACAACGCCATGAG	100	TATTCTTTAGCGTTGGGT
73	ACGTTGGATGTAGTTACTGACTGCACGAAG	ACGTTGGATGGTACCCATAAGCAACTCTTC	94	ACGAAGTGTCAAGTGCACAG
45	ACGTTGGATGATTTACAGCATAGCTGGAC	ACGTTGGATGTCTGCGAAGTCTTTCTTGCC	102	gAGTACCGAGGGCAGTGTAA
59	ACGTTGGATGTGGACATAGAGGTTTTAGGC	ACGTTGGATGAGAGGCTGAAACCAAGACAC	107	gCTATAACAGCGTATCAGCAG
56	ACGTTGGATGGACTATTCAGTGTATGGAGC	ACGTTGGATGCGGACTTTGACATCTGTAGC	105	ATGGACTACACTAGAAAAGTA
68	ACGTTGGATGACTGCTGGACCAGTAAGCGA	ACGTTGGATGGGGCTTTGGTCCATGCATAG	106	gTGGACCAGTAAGCGAGAGGAC
18	ACGTTGGATGAGCATGGGGTATACTGTCTC	ACGTTGGATGACCTGTGTATATTGCAAGAC	101	AAATTCAAATACCTCTGTAAGTT
33	ACGTTGGATGCTAATTTTAGATAAGAACC GC	ACGTTGGATGACAGTTGTATATAGAGAGGG	113	TTAGATAAGAACC GCAACACAG
31	ACGTTGGATGAACATAGGAGGAAGGTGGAC	ACGTTGGATGCACGCATGTTTACACTTGGG	114	gGCATAGCATGTTGGAGAAGACC
rs45511401	ACGTTGGATGTGAGAGCAGGGACGACTTTC	ACGTTGGATGCGTTTCAGCATCACCTTCTC	114	aTGGCCACCACGGCCACCAAGCA
51	ACGTTGGATGCAATACACACACTACTCTG	ACGTTGGATGAAGAGGGGAAAGACCACGAAC	120	cCTACCTGTATATTGTGCATAGAAA
52	ACGTTGGATGCTGTTGAGAGTGTGGAGAC	ACGTTGGATGTAGTTGCTTTGCTCCACGC	105	TTGAGAGTGTGGAGACCCCGACCT
35	ACGTTGGATGGTGTATGGAGAAACGTTAG	ACGTTGGATGTGGACACAGCGGTTTTGAC	96	TGTATGGAGAAACGTTAGAAAAACA

Figura 18 - Output dell' Assay design. In alto la plex per la detection dei PyVs e in basso quella per gli HPV.

3.9.2. Allestimento della PCR nella piastra 384-well

L'amplificazione genica delle sequenze bersaglio delimitate dai primers *First* e *Second* avviene in una piastra da 384 pozzetti che contiene 384 campioni e 1 delle due diverse plex. Le fasi descritte in seguito devono essere ripetute per analizzare gli stessi 384 campioni per la seconda plex. Nel dettaglio, il protocollo per l'allestimento della PCR in una piastra da 384 pozzetti prevede i seguenti passaggi:

- ❖ Risospensione di tutti i primers in acqua milliQ, in modo che ciascuno abbia una concentrazione finale di 50 uM ;
- ❖ Preparare la primers mix per ciascuna *plex* nella quale ogni primer ha una concentrazione di 500 nM in un volume finale di 230,4 ul.
- ❖ Preparazione della mix di PCR per ciascuna *plex*: alla primers mix si aggiungono i reagenti elencati nella Tabella 8 sottostante.

Reagenti	Volume
H ₂ O MilliQ	874 µL
PCR Buffer (10x)	230.4 µL
MgCl ₂	184.3 µL
dNTPs	46 µL
Hotstar Taq (5 U/ µL)	46 µL
Volume totale	1380.7 µL

Tabella 8 - Mix di PCR

- ❖ Dispensare, con una pipetta multicanale 4 ul in ciascun pozzetto della piastra;
- ❖ Dispensare con la pipetta multicanale 1ul di DNA dei campioni, prelevandoli dalle 4 piastre da 96;
- ❖ Incubare la piastra nel Thermal cycler (DNA Engine® Petier Thermal Cycler BIO RAD) con il seguente ciclo:

94°C	4'		
94°C	20''	}	45 cicli
56°C	30''		
72°C	1'		
72°C	3'		
4°C	∞		

- ❖ A PCR avvenuta eseguire un controllo random su 12 campioni random per verificare la riuscita della PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio.

3.9.3. Aggiunta della soluzione di purificazione SAP

Dopo l'amplificazione il prodotto di PCR viene purificato con l'enzima Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), il quale defosforila i dNTPs non incorporati durante l'amplificazione rendendoli inutilizzabili. Si allestisce una soluzione composta come mostrato in Tabella 9 :

REAGENTI	Volume (384 camp.)
H ₂ O MilliQ	810.9 μL
SAP Buffer (10x)	90.1 μL
SAP Enzyme	159.0 μL
Volume totale	1060 μL

Tabella 9 - Soluzione SAP

La soluzione SAP viene dispensata in una piastra da 96 pozzetti e successivamente viene aggiunta alla piastra 384 contenente i prodotti di PCR attraverso lo strumento *PLATEMate 2x2 (MATRIX)* (Figura 19) il quale trasferisce con un sistema di pipettaggio automatizzato 2ul di soluzione SAP in ciascuno dei 384 pozzetti.

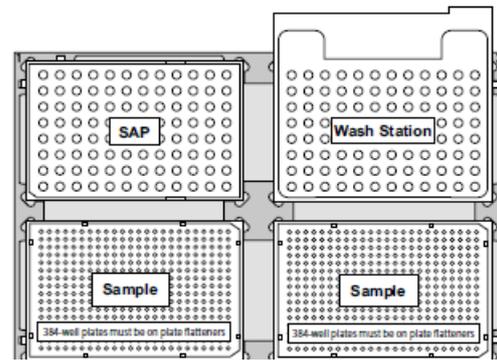
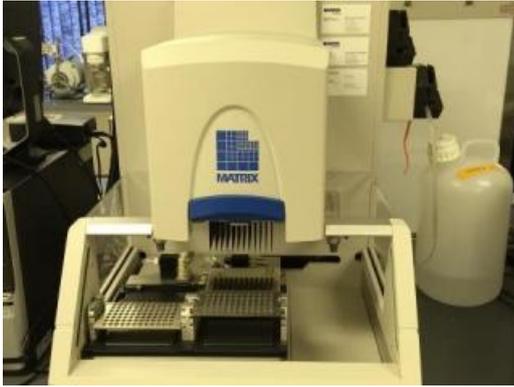


Figura 19 – A sinistra il PlateMate Matrix 2x2; a destra la workstation dove avviene il trasferimento della SAP dalla piastra da 96 alla piastra con i campioni

In seguito la piastra 384 viene incubata nel Thermal cycler (DNA Engine[®] Petier Thermal Cycler BIO RAD) con il ciclo:

Temperatura [°C]	Durata [min]
37	40
85	5
4	∞

Tabella 10 - Thermal cycler step

3.9.4. Allestimento dell'iPLEX

Nella reazione di iPLEX il primer di extension è complementare alla regione che fiancheggia lo SNP contenuto in ciascun amplicone e, in particolare, si lega alla porzione 3'-terminale adiacente al polimorfismo. Grazie alla presenza di 4 diversi gruppi di terminatori (ddACG, ddACT, ddAGT, ddCGT) l'allungamento in direzione 5'-3' comprende una sola base, ossia quella che corrisponde allo SNP. In questo modo vengono creati degli ampliconi che differiscono per una singola base. Anche in questo caso i primers vengono risospesi in acqua milliQ, a una concentrazione 400 uM, e successivamente viene preparata la primers mix. Nell' eseguire la reazione di iPLEX infatti risulta molto importante l'aggiustamento delle concentrazioni degli oligo al fine di equilibrare il rapporto tra il segnale del campione e il rumore di fondo: per fare ciò si dividono i primers in diversi gruppi a seconda della loro massa: i primers con massa maggiore saranno concentrati di più rispetto ai primers con massa minore (Figura 20).

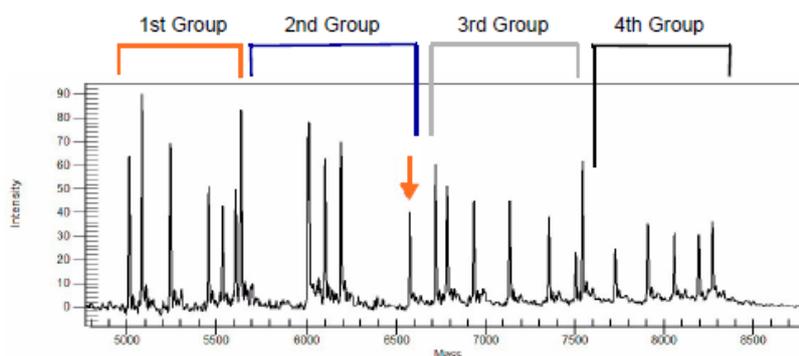


Figura 20 - Suddivisione dei primers di extension in quattro gruppi sulla base delle loro masse

Alla primers mix si aggiungono i reagenti elencati nella sottostante Tabella 11, in modo da creare l'*iPLEX cocktail*:

Reagenti	Volume
H2O MilliQ	384.06 μ l
iPLEX Buffer Plus (10X)	106 μ l
iPLEX Termination Mix	106 μ l
Enzima iPLEX	21.74 μ l
Volume finale	617.8 μ l

Tabella 11 - iPLEX mix

L'*iPLEX cocktail* viene dispensato in una piastra da 96 pozzetti e successivamente viene aggiunto alla piastra 384 contenente gli analiti attraverso lo strumento *PLATEMate 2x2 (MATRIX)*, il quale trasferisce 2ul di soluzione in ciascuno dei 384 pozzetti. In seguito la piastra 384 viene incubata nel Thermal cycler (*DNA Engine[®] Petier Thermal Cycler BIO RAD*) con il ciclo:

94°C	30''		
94°C	5''	}	40 cicli
52°C	5''		
80°C	5'	}	5 cicli
72°C	3'		
4°C	∞		

3.9.5. Trattamento con Resina

Vengono aggiunti 25ul di Acqua MilliQ tramite l'utilizzo del PLATEMate 2x2 (MATRIX), al fine di diluire i campioni per l'analisi in spettrometria di massa. Per desalinizzare la reazione di iPLEX, viene aggiunta in ciascun pozzetto della piastra 384 4ng di resina (*Clean Resin Sequenom*) che agisce da scambiatore di anioni. Questo passaggio avviene tramite l'utilizzo di un'apposita piastra definita "dimple plate" (Figura 21) che viene rovesciata sulla piastra 384 contenente gli analiti. La piastra viene quindi inserita in un rotore per circa mezz'ora, così da risospendere le soluzioni contenenti la resina, l'acqua e gli analiti.

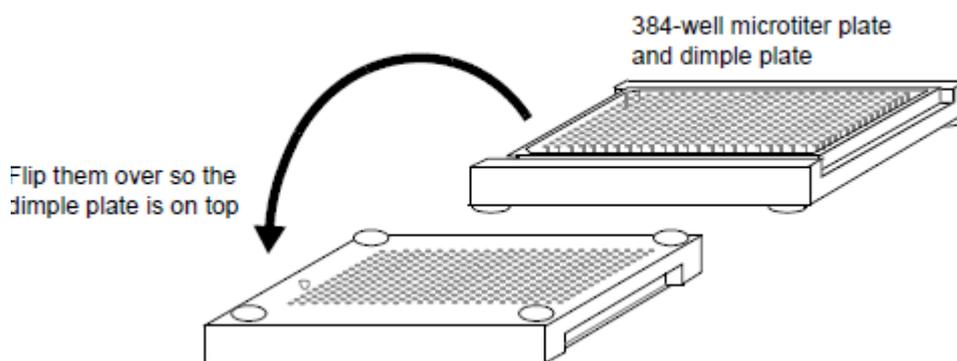


Figura 21 - Aggiunta della resina tramite il rovesciamento della Dimple plate sulla piastra 384

3.9.6. Nanodispensing

Il trasferimento degli analiti dalla piastra 384 al microchip di silice contenente i 384 siti (definiti pad) con la matrice proteica (SpectroCHIP bioarray®), (

Figura 22) avviene per mezzo dello strumento MassARRAY™ Nanodispenser (Samsung), (Figura 23).



Figura 22 - SpectroCHIP bioarray



Figura 23 - MassARRAYTM Nanodispenser

Esso è fornito di un blocco mobile di 24 puntali, definiti *Pin*, in grado di eseguire dei movimenti che permettono il pipettaggio piezoelettrico. La geometria di tali movimenti è gestita da un software, ed è rappresentata nella Figura 24. Tale software permette anche di impostare diversi parametri che coordinano il pipettaggio, tra cui la velocità di rilascio degli analiti sul chip: la quantità di analita rilasciato è direttamente proporzionale a tale velocità, che mediamente risulta ottimale intorno al valore di 90 mm/sec. Aumentando la velocità di dispensazione aumenta il volume dispensato sul chip; è necessario effettuare delle prove di velocità di dispensazione (Volume Check) poiché plex composte da molti SNPs richiedono minore velocità di dispensazione (70 mm/sec). Inoltre il software contiene delle impostazioni dedicate alla dispensazione di un calibrante su degli appositi siti del chip, il quale sarà necessario per equilibrare la potenza del laser durante l'applicazione MALDI TOF.

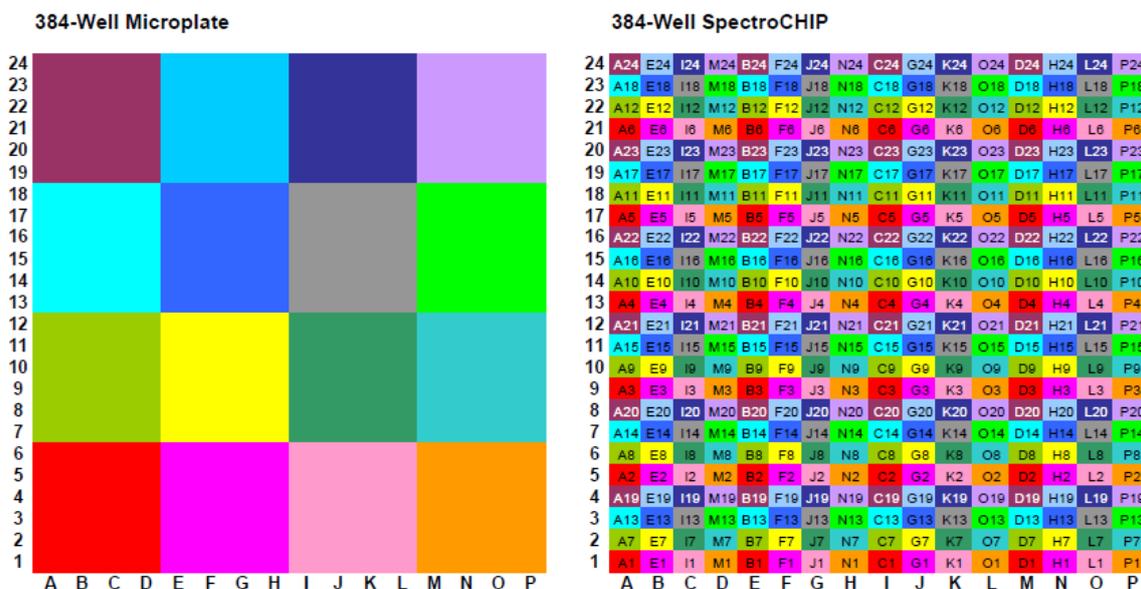


Figura 24 - Geometria di dispensazione del Nanodispenser: ciascun colore del diagramma di sinistra (piastra 384 contenente gli analiti) rappresenta un ciclo di caricamento di 24 Pin. Nel diagramma di destra (microchip) sono rappresentati con lo stesso colore i siti di destinazione sul chip

3.9.7. Analisi MS-MALDI TOF

Il chip da processare viene inserito nello spettrometro di massa. In un sistema vuoto ciascun analita viene irradiato da un fascio di luce laser, co-cristallizza con i cationi ceduti dalla matrice e, sottoposto ad un campo elettrico, attraversa l'analizzatore TOF (Figura 25) (Figura 26).

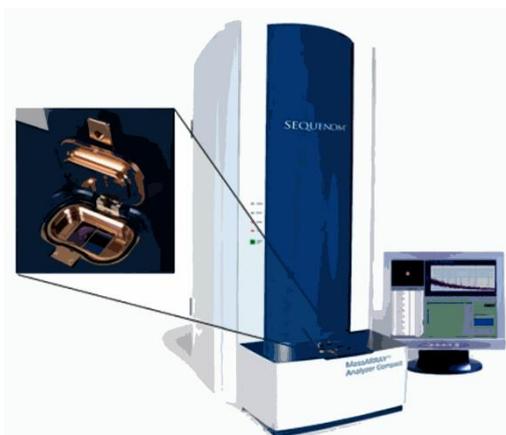


Figura 25 - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight (MALDI TOF)

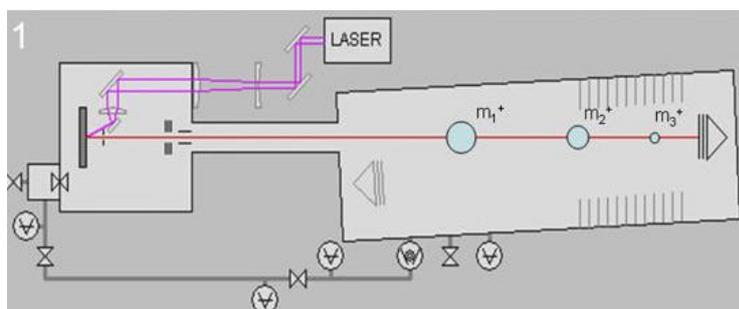


Figura 26 - Schema di funzionamento del MALDI- TOF

Il processamento è supportato dal programma *Typar 4.0.20*, che contiene un database, dove vengono archiviati i dati di tutti gli esperimenti, e l'insieme dei software necessari.

1. PlateEditor

Permette di creare un *plate* virtuale (che riproduce la piastra di lavoro utilizzata per l'esperimento). I campioni e le plex vengono caricate e associate alla piastra (Figura 27).

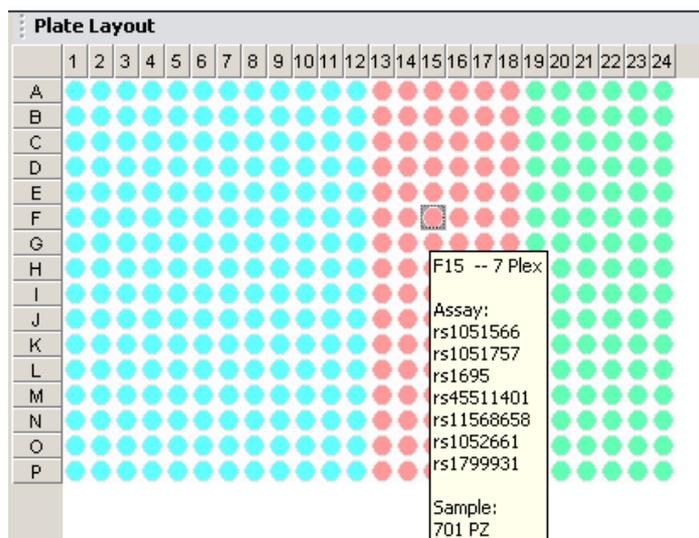


Figura 27 - Esempio di Plate creato dal PlateEditor

2. ChipLinker

Permette di associare al *plate* virtuale creato il microchip (*SpectroCHIP bioarray*®) da processare, assegnando al *plate* il barcode presente sul chip (Figura 28).



Figura 28 - *SpectroCHIP bioarray*

3. SpectroACQUIRE

Questo è il programma che gestisce l'acquisizione dei dati. Prima di avviare l'analisi, viene effettuato l'acquisizione dei dati relativi al calibrante: il laser irradia i pad che lo contengono ed in seguito viene visualizzato lo spettro dei picchi di assorbimento; vengono visualizzati tre picchi: perché il sistema di detenzione possa essere ritenuto funzionante, l'altezza massima del picco più alto deve avere un'intensità massima di 255, corrispondente ad una massa di circa 9.000 Da, e il picco vicino al primo deve essere la metà esatta del terzo. In caso contrario è possibile modulare l'intensità del laser (Figura 29).

A questo punto è possibile avviare l'acquisizione dei dati.

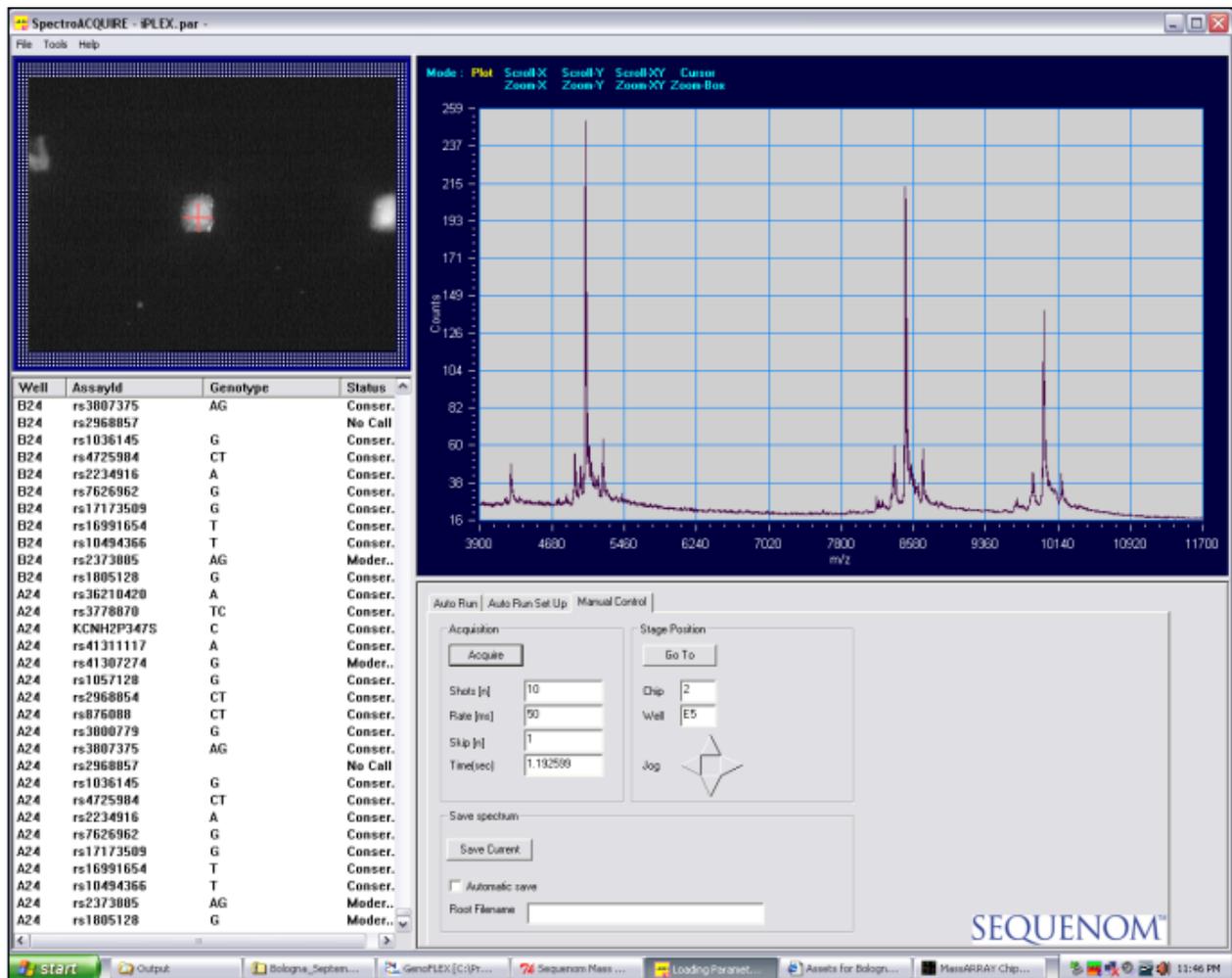


Figura 29 - Software Spectro ACQUIRE :spettro di assorbimento del calibrante in cui è possibile visualizzare i tre picchi di riferimento per l'acquisizione dei dati nell'analisi di genotyping

3.10. Separazione immunomagnetica

Per valutare la sensibilità del metodo abbiamo utilizzato una metodica di isolamento esosomi alternativa. Gli esosomi dei fluidi biologici, siero e urina, sono stati isolati con il kit di isolamento di *immunobead CD9* (Hansa-Biomed) secondo il protocollo del produttore. In breve, i campioni dei fluidi biologici, sono stati prima sottoposti a diverse centrifughe per eliminare mediante precipitazione i detriti cellulari. 10 µl di biglie sono stati aggiunti ai campioni e incubati 4°C in un thermomixer per tutta la notte. Il giorno dopo, i campioni sono stati sottoposti a diverse centrifugate di 5000 rpm per 10 min, per raccogliere la frazione CD9 negativa. Le immunobeads sono state risospese in 50µl di buffer di eluizione per gli esosomi e centrifugate due volte a 5000 rpm per 10 minuti, per raccogliere due CD9 frazioni positive. Gli esosomi così isolati sono stati sottoposti al trattamento con la DNAsi descritto precedentemente nel paragrafo 3.6 sia nella frazione CD9 negativa che in quella CD9 positiva. I campioni derivati sono stati analizzati mediante spettrometria di massa e i risultati confrontati con le positività virali ottenute mediante isolamento esosomiale basato sul PEG.

4. Risultati

4.1. Analisi della casistica

La totalità della casistica reclutata consta di 72 pazienti (57 trapiantati da donatore deceduto e 15 da donatore vivente) e 15 donatori del trapianto da vivente. Per ogni soggetto reclutato (87) sono stati collezionati 5 campionamenti per un totale di 435 campioni di siero e 363 campioni di urine (il numero inferiore è dovuto al fatto che la maggior parte dei pazienti reclutati era anurico e pertanto il campionamento basale è risultato essere indisponibile). L'analisi ha incluso un trattamento enzimatico con DNAsi I (per eliminare il DNA non contenuto nelle nano vescicole) che ha raddoppiato il numero dei campioni da esaminare, (1602 campioni). Da questo numero totale di campioni sono state isolate le NV (NV) mediante metodica di precipitazione con resina a base di polietilenglicole (PEG) e, dopo estrazione del DNA, è stata effettuata l'analisi dei genomi virali mediante spettrometria di massa. Alcuni di essi sono stati testati in replicato per valutare la riproducibilità del metodo di determinazione dei genomi virali (Figura 30).

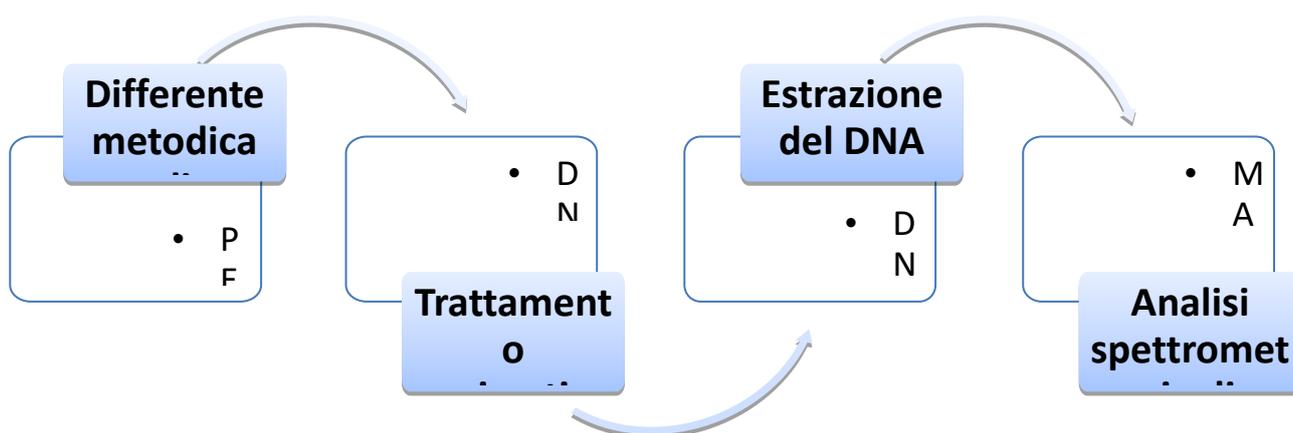


Figura 30 - Flow chart del protocollo

L'età media dei pazienti inclusi è di ± 50 anni, (46 di sesso maschile e 26 di sesso femminile) (Tabella 12).

ID studio	Sesso	Età	Status
RIC 1	F	30	V
CAD1	M	63	M
CAD2	M	44	M
RIC 2	M	36	V
RIC 3	M	38	V
CAD3	F	61	M
CAD4	M	44	M

CAD5	F	61	M
CAD6	M	63	M
CAD7	M	59	M
CAD8	M	39	M
CAD9	M	36	M
CAD10	F	65	M
CAD11	M	69	M
CAD12	F	51	M
RIC 4	F	25	V
CAD13	F	62	M
CAD14	M	55	M
RIC 5	F	23	V
CAD15	M	38	M
CAD16	M	61	M
CAD17	M	57	M
CAD18	F	61	M
CAD19	F	69	M
CAD20	M	42	M
CAD21	F	50	M
CAD22	M	72	M
CAD23	M	58	M
CAD24	F	16	M
RIC 6	M	37	V
CAD25	M	64	M
RIC 7	M	57	V
CAD26	M	38	M
CAD27	F	43	M
RIC 8	M	48	V
CAD28	M	26	M
CAD29	F	29	M
CAD30	M	70	M
CAD31	M	60	M
CAD32	F	51	M
RIC 9	F	30	V
CAD33	M	57	M
CAD34	F	52	M
CAD35	F	66	M
CAD36	M	65	M
RIC 10	F	53	V
RIC 11	M	31	V
CAD37	M	55	M
CAD38	M	52	M
CAD39	M	54	M
RIC 12	M	32	V
CAD40	M	52	M
CAD41	M	63	M
CAD42	F	70	M

CAD43	M	65	M
CAD44	M	63	M
CAD45	M	66	M
CAD46	M	55	M
CAD47	M	24	M
CAD48	F	60	M
CAD49	M	43	M
RIC 13	F	34	V
CAD50	M	41	M
CAD51	M	51	M
CAD52	F	58	M
CAD53	F	37	M
CAD54	F	43	M
CAD55	M	45	M
CAD56	M	44	M
RIC 14	F	32	V
CAD57	M	57	M
RIC 15	M	65	V

Tabella 12 - Descrizione della casistica. V: Trapianto da donatore vivente; M: trapianto da donatore deceduto

4.2. Caratterizzazione delle nanovesicole

Per esaminare la qualità delle NV isolate, sono state inserite due verifiche effettuate all'Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la cura dei Tumori (IRST - Meldola): il Nanoparticle tracking analysis (NTA) e il MACSplex.

4.2.1. Nanoparticle tracking analysis (NTA)

Le NV sono state analizzate utilizzando il sistema di caratterizzazione delle nanoparticelle NS500 (Nanosight Malvern Instruments). Questo strumento permette di misurare la distribuzione, il numero e la dimensione media delle particelle, visualizzate in un file grafico. Le figure sottostanti sono esempi delle quantificazioni effettuate sui nostri campioni di NV sieriche e urinarie.

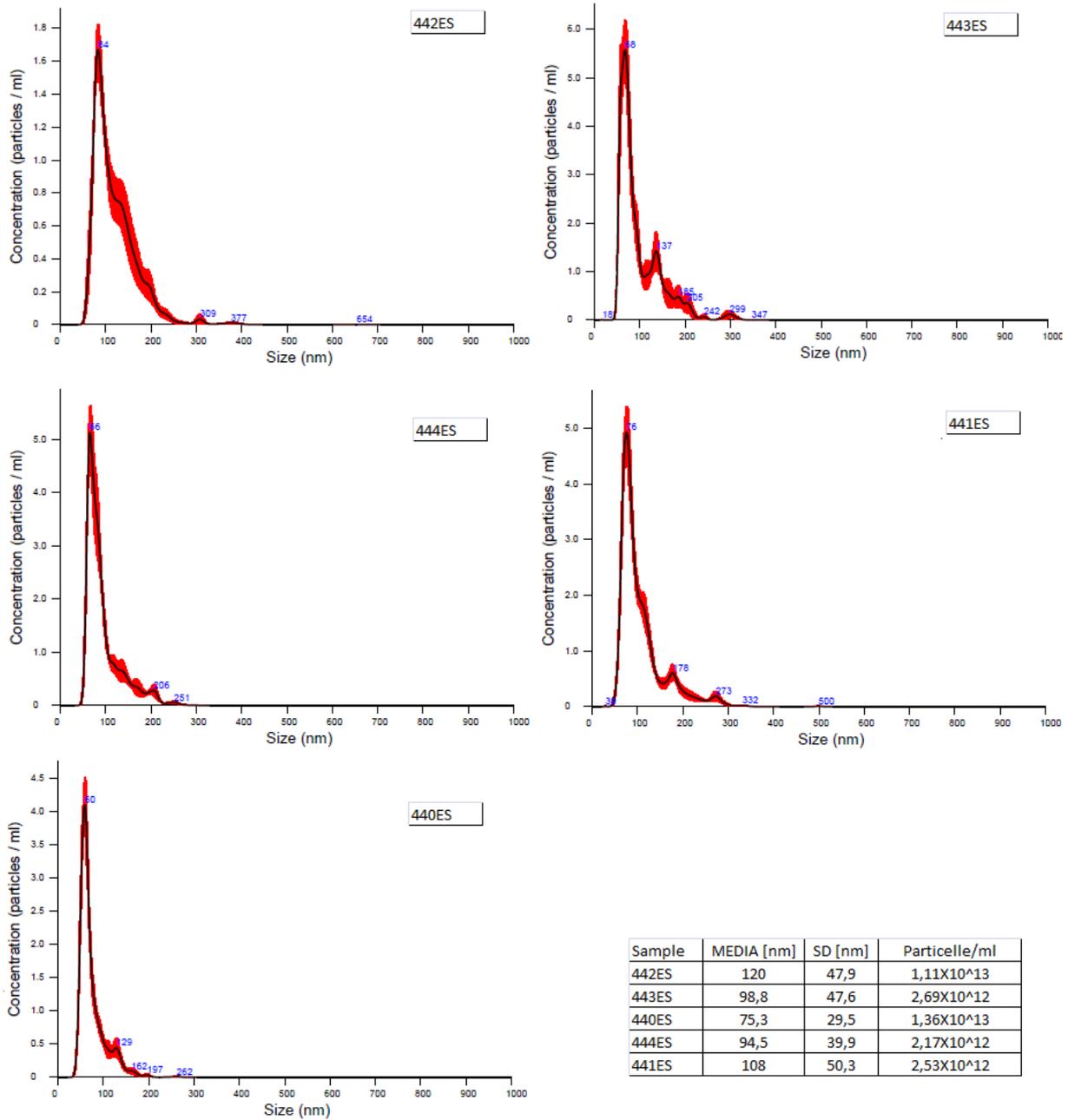


Figura 31 - Analisi delle NV sieriche

Le NV sieriche isolate mediante PEG e analizzate mediante NTA, mostrano dimensioni comprese fra i 75 e i 120 nm, compatibili quindi con le dimensioni delle NV, e concentrazioni comprese fra 10^{12} – 10^{13} per ml (Figura 31).

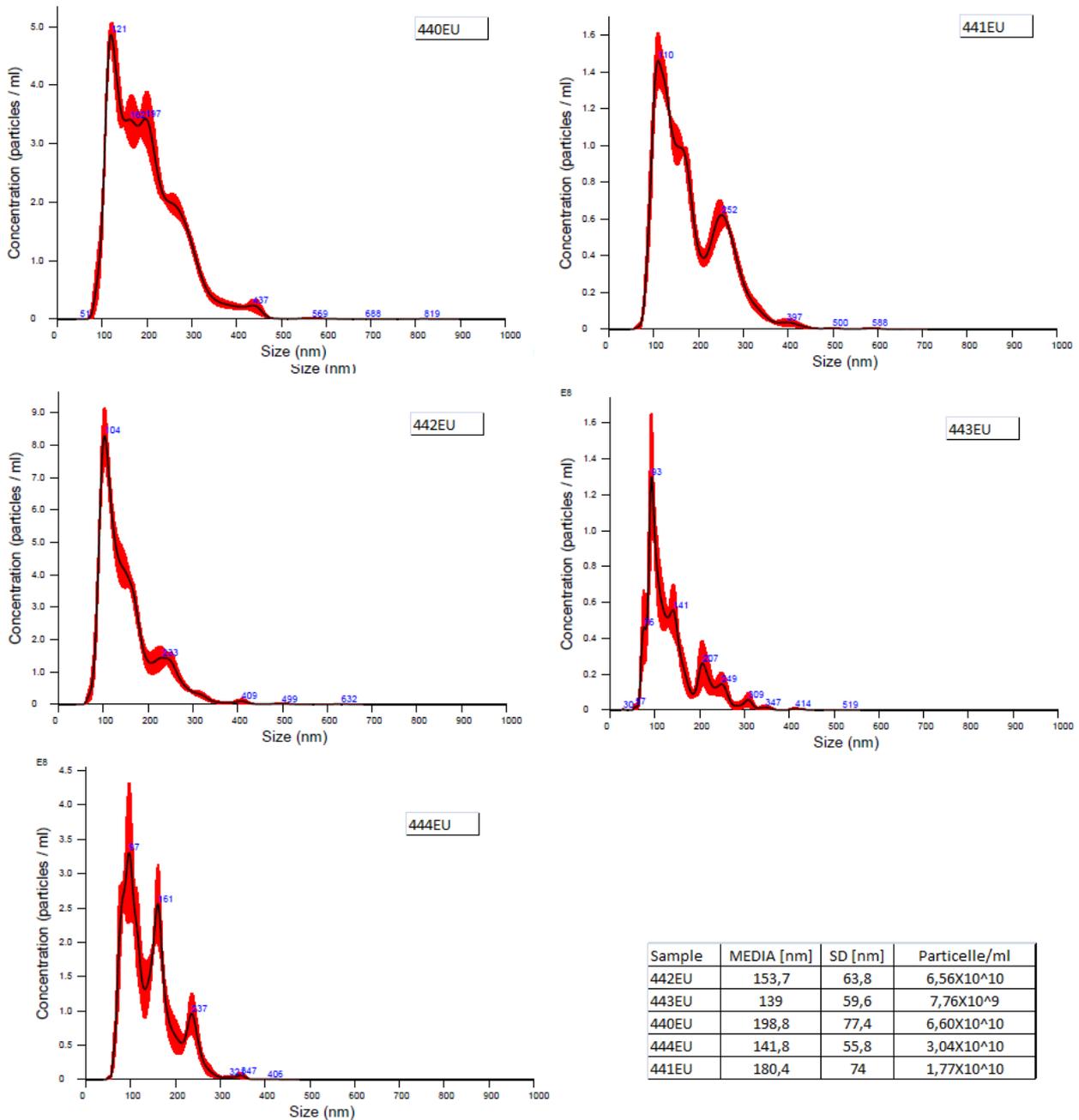


Figura 32 - Analisi delle NV urinarie

Le NV urinarie, invece, mostrano dimensioni comprese fra i 139 e i 198 nm (quindi leggermente più grandi di quelle sieriche) e concentrazioni comprese fra $10^9 - 10^{10}$ per ml. Questi valori, come i precedenti, sono in linea con quanto atteso in letteratura. La differenza di quasi tre ordini di grandezza rispetto al siero potrebbe riflettere la maggiore diluizione del campione di urine rispetto a quello sierico (Figura 32).

4.2.2. MACSplex Exosome Kit

Dopo aver verificato che le NV si collocano nel range dimensionale degli esosomi e che la loro quantità è paragonabile ai dati già riportati in letteratura, sono stati tipizzati i marcatori di superficie delle microvescicole isolate per verificare se fossero presenti quelli comunemente associati agli esosomi. Quest'analisi è stata condotta utilizzando il MACSplex Exosome kit (Miltenyi Biotec) che consente la rilevazione contemporanea di 37 epitopi nanovescolari ed esosomiali di superficie più due controlli. Come descritto nel paragrafo 3.5, il MACSplex comprende un cocktail di varie popolazioni di microsferi fluorescenti di polistirene, ciascuna rivestita da un anticorpo specifico che lega il rispettivo epitopo di superficie. Le 39 popolazioni di microsferi possono essere così distinte dalle diverse intensità di fluorescenza mediante citometria a flusso, in una matrice bidimensionale.

Utilizzando la metodica MACSplex su NV isolate da siero e urine di diversi pazienti, si osservano profili di espressione che rilevano la presenza di alcuni degli antigeni comunemente associati ad esosomi. In particolare il CD9 è molto espresso in tutti i campioni. Il CD63 è, invece, poco espresso mentre il CD81 è spesso sotto la soglia di rilevazione. Tuttavia, il profilo di espressione varia al variare del fluido biologico preso in esame. Nel siero, ad esempio, sono presenti vescicole di probabile origine piastrinica e immunitaria portatrici dei marcatori CD49e, HLA-BC, CD62P, CD41b, CD42a, CD29 e CD31. Questi marcatori sono condivisi da tutti i campioni presi in esame raffigurati in Tabella 13.

NV sieriche

Marcatori esosomiali

	440	441	442	443	444
CD49e	CD49e	CD49e	CD49e	CD49e	CD49e
CD9	CD9	CD9	CD9	CD9	CD9
HLA-BC	HLA-BC	HLA-BC	HLA-BC	HLA-BC	HLA-BC
CD63	CD63	CD63	CD63	CD63	CD63
CD40		CD40	CD40	CD40	CD40
CD62P	CD62P	CD62P	CD62P	CD62P	CD62P
CD81	CD81	CD81	CD81	CD81	CD81
CD41b	CD41b	CD41b	CD41b	CD41b	CD41b
CD42a	CD42a	CD42a	CD42a	CD42a	CD42a
		CD44	CD44		
CD29	CD29	CD29	CD29	CD29	CD29
			CD45		
CD31	CD31	CD31	CD31	CD31	CD31

Tabella 13 – Riassunto marcatori esosomiali e nano vescicolari positivi nei campioni di NV sieriche isolati mediante PEG. In blu sono segnati i marcatori condivisi da tutti i campioni

In due dei cinque campioni di NV sieriche (442 e 444) (Figura 33), sono stati analizzati i profili di espressione pre trapianto (T0) e post trapianto (T1). Dal confronto dei marcatori esosomiali è emerso che queste vescicole sembrano mantenersi costanti nel tempo senza che il trapianto adduca modificazioni significative.

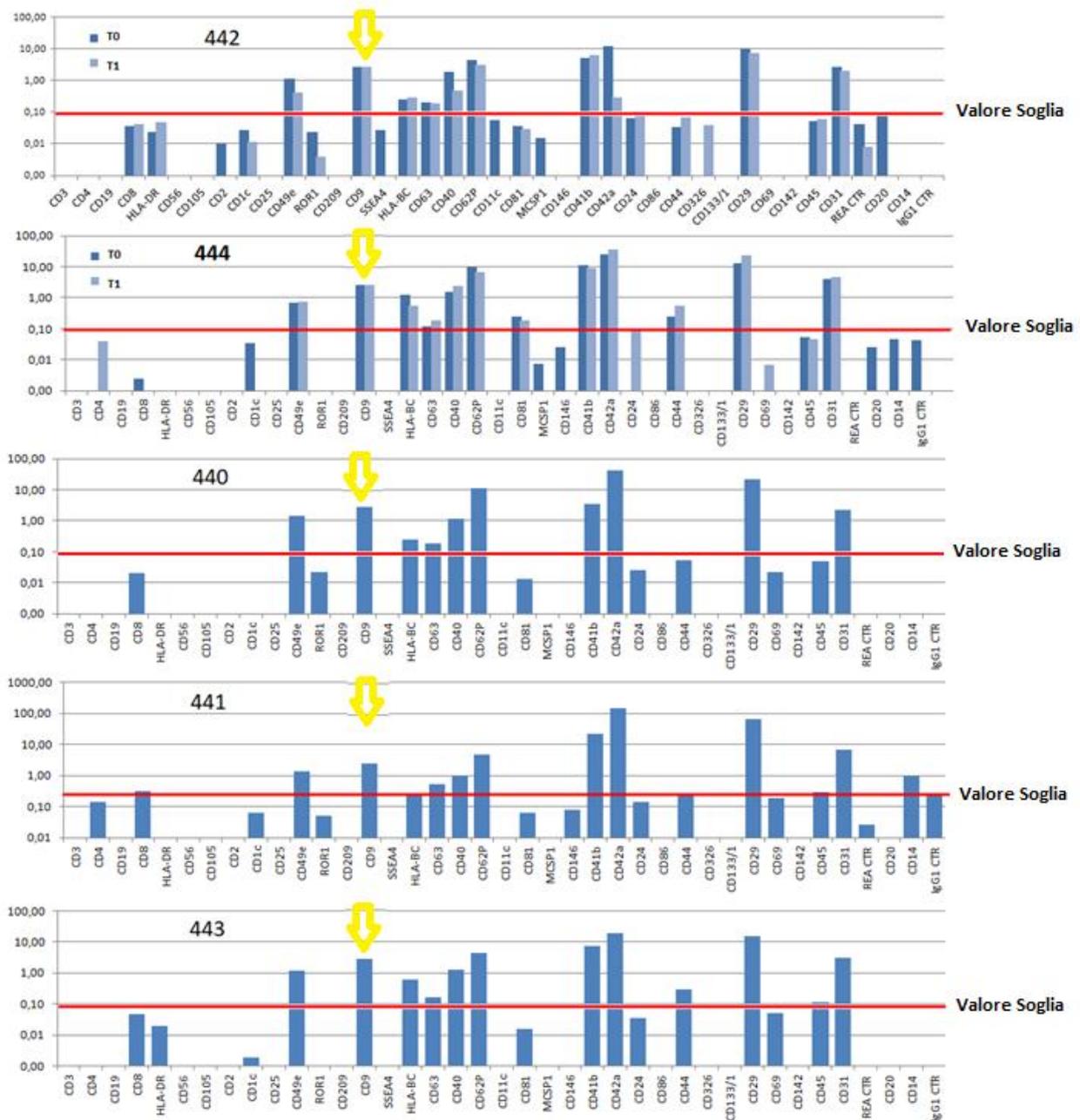


Figura 33 – Profili di espressione degli epitopi esosomiali in NV sieriche isolati con PEG

I profili di espressione derivati dalla metodica MACSplex su NV urinarie, oltre alla presenza dei marcatori CD9, CD81 e CD63, hanno evidenziato che le vescicole isolate sono tipiche del tratto urinario (CD133/1) e come già descritto da Bussolati sono correlate all'evoluzione del trapianto renale (Figura 34). Ciò indica un arricchimento di esosomi rispetto al totale delle NV in rapporto al siero. I marcatori evidenziati in blu in Tabella 14 sono quelli condivisi in tutti i campioni testati.

NV urinarie

Marcatori esosomiali

440	441	442	443	444
HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR
			CD2	
			CD25	
			CD209	
CD9	CD9	CD9	CD9	CD9
SSEA-4	SSEA-4	SSEA-4	SSEA-4	SSEA-4
HLA-BC ?	HLA-BC ?	HLA-BC	HLA-BC	
CD63	CD63	CD63	CD63	CD63
CD40	CD40 ?		CD40 ?	CD40 ?
				CD62P
CD81	CD81	CD81	CD81	CD81
				CD41b
				CD42a
CD24	CD24	CD24	CD24	CD24
CD44			CD44 ?	CD44
CD326	CD326	CD326	CD326	CD326
CD133/1	CD133/1	CD133/1	CD133/1	CD133/1
CD29	CD29 ?	CD29 ?	CD29 ?	CD29
CD142			CD142	
CD45				CD45
CD31			CD31	CD31
CD14				CD14

Tabella 14 - Riassunto marcatori esosomiali positivi nei campioni di NV urinarie isolati mediante PEG. In blu sono segnati i marcatori condivisi da tutti i campioni

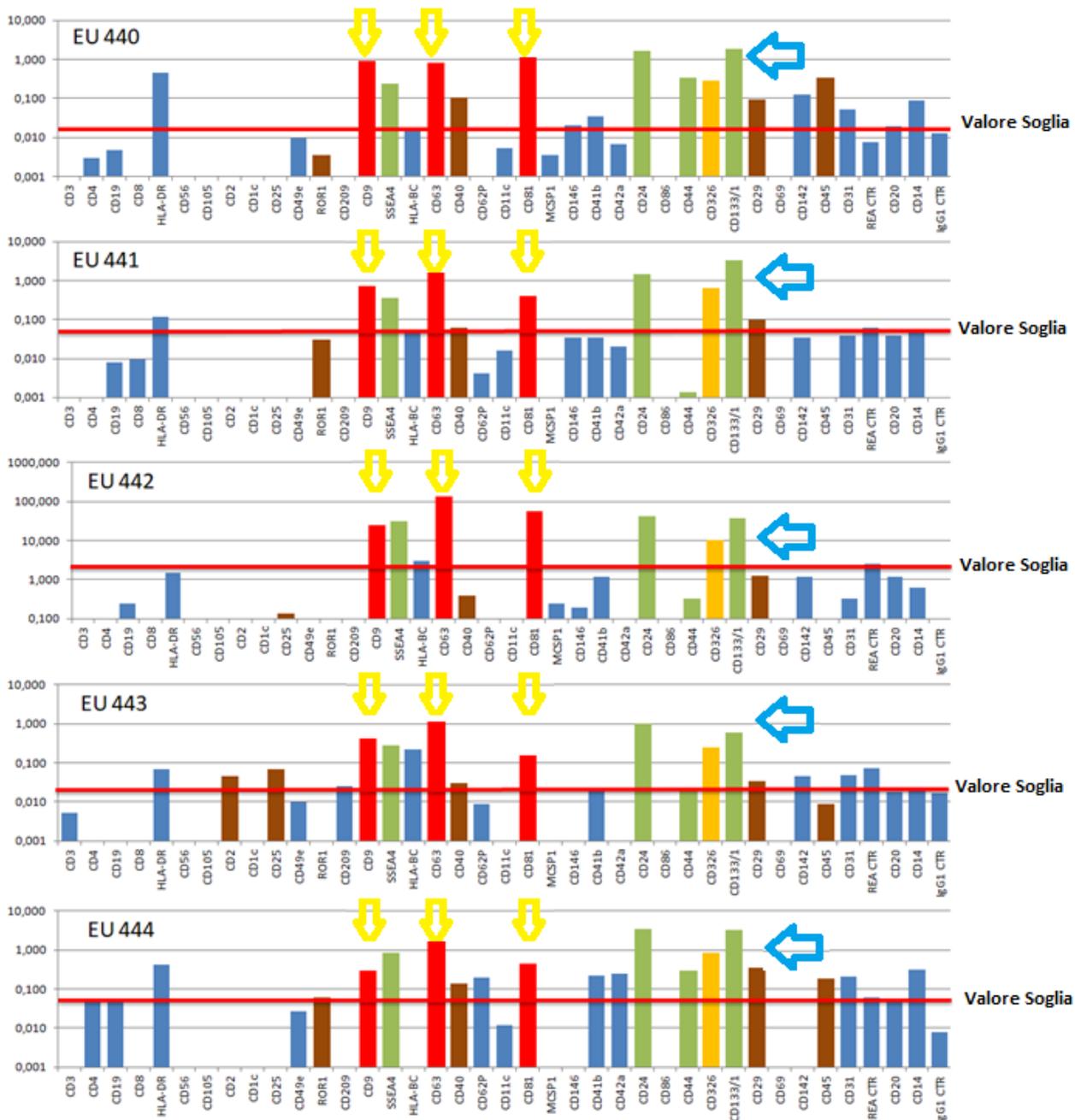


Figura 34 - Profili di espressione degli epitopi esosomiali in NV urinarie isolate con PEG

4.3. Esiti della determinazione dei genomi virali

Come descritto nei metodi, per questo lavoro sono state analizzate 22 piastre da 95 campioni ciascuna, con due plex distinte (18PyVs e 16HPV mucosali), per un totale di 11 chip da 384 campioni. In ciascuna delle due plex sono stati inseriti degli SNP di controllo per il DNA genomico: rs45511401 e rs28362491. Infatti, il DNA genomico è presente, seppur in piccola quantità, nelle vescicole circolanti, come recentemente dimostrato da Hur (2018) e Takur (2016). Le possibilità attese a seguito della genotipizzazione e le relative soluzioni adottate sono riportate nella Tabella 15:

	rs45511401	rs28362491	PyVs	HPV	
Risultato 1	nc	nc	nc	nc	ripetere
Risultato 2	nc	nc	OK	OK	campione incluso
Risultato 3	OK	OK	nc	nc	campione incluso
Risultato 4	OK	OK	OK	OK	campione incluso

Tabella 15 - Le possibilità attese dal genotyping. Nc: not call, intesa come nessuna chiamata per tutti i genotipi virali e genomici; OK: positività isolate o complete

La maggior parte dei campioni ha dato un risultato positivo già dal primo esperimento ed alcuni sono stati scelti random e inseriti nei chip successivi per valutare la riproducibilità del metodo. Per questi campioni, la genotipizzazione ha sempre confermato il risultato della prima analisi. Dei 1602 campioni analizzati, 281 sono stati reinseriti nei chip successivi per rider minare la presenza dei genomi virali.

4.4. Il viroma dei donatori mediante MALDI- TOF

La presenza dei genomi virali, oggetto di questo studio, è stata in primis validata nei campioni dei donatori sani. La Tabella 16 riassume quali percentuali di soggetti sia positiva per i genomi virali rilevati dallo spettrometro di massa, rispettivamente negli esosomi sierici e urinari, e come abbiano reagito o meno al trattamento con la DNAsi I.

PyVs da NV sieriche dei donatori non trattati con DNAsi I							
Timing	HPyV6	TSPyV	BPyV1	JCV	BKV	SV12	MCPyV
T0	7,69	0,00	7,69	15,38	61,54	0,00	7,69
T1	7,69	0,00	0,00	15,38	38,46	23,08	7,69
T2	16,67	0,00	0,00	0,00	32,00	16,67	0,00
T3	7,69	7,69	0,00	0,00	30,77	7,69	23,08
T4	15,38	0,00	0,00	0,00	23,08	30,77	15,38

PyVs da NV urinarie dei donatori non trattati con DNAsi I								
Timing	HPyV6	BPyV2	MWPyV	JCV	BKV	SV12	HPyV7	MCPyV
T0	7,69	0,00	7,69	53,85	38,46	7,69	15,38	7,69
T1	30,77	0,00	0,00	46,15	15,38	15,38	7,69	7,69
T2	16,67	0,00	0,00	41,67	25,00	16,67	8,33	16,67
T3	16,67	0,00	0,00	66,67	16,67	8,33	8,33	0,00
T4	7,69	7,69	0,00	69,23	7,69	15,38	0,00	23,08

PyVs da NV sieriche dei donatori trattati con DNAsi I							
Timing	HPyV6	TSPyV	BPyV1	JCV	BKV	SV12	MCPyV
T0	7,69	0,00	7,69	0,00	53,85	0,00	7,69
T1	15,38	0,00	0,00	0,00	7,69	0,00	7,69
T2	8,33	0,00	0,00	0,00	41,67	25,00	8,33
T3	15,38	0,00	0,00	0,00	30,77	7,69	7,69
T4	0,00	0,00	0,00	0,00	46,15	0,00	15,38

PyVs da NV urinarie dei donatori trattati con DNAsi I								
Timing	HPyV6	BPyV2	MWPyV	JCV	BKV	SV12	HPyV7	MCPyV
T0	15,38	0,00	7,69	46,15	46,15	15,38	7,69	30,77
T1	23,08	0,00	0,00	30,77	23,08	23,08	7,69	15,38
T2	0,00	8,33	0,00	25,00	16,67	8,33	0,00	8,33
T3	16,67	0,00	0,00	25,00	33,33	8,33	8,33	0,00
T4	23,08	0,00	0,00	30,77	7,69	7,69	0,00	15,38

Tabella 16 - Cinetica infettiva dei genomi virali dei PyVs rilevati in NV sieriche e urinarie trattati (rosso) e non (blu). I numeri si riferiscono alle percentuali di positività identificate per ogni genoma virale.

I genomi virali della famiglia dei Polyomavirus nei donatori, nonostante essi siano considerati sani e idonei al trapianto renale, sono rilevabili nelle NV sieriche e urinarie. (Figura 35). In particolare il genoma virale del BKV nel siero è quello più rappresentato, mentre nelle urine al BKV si aggiunge anche il genoma virale del JCV.

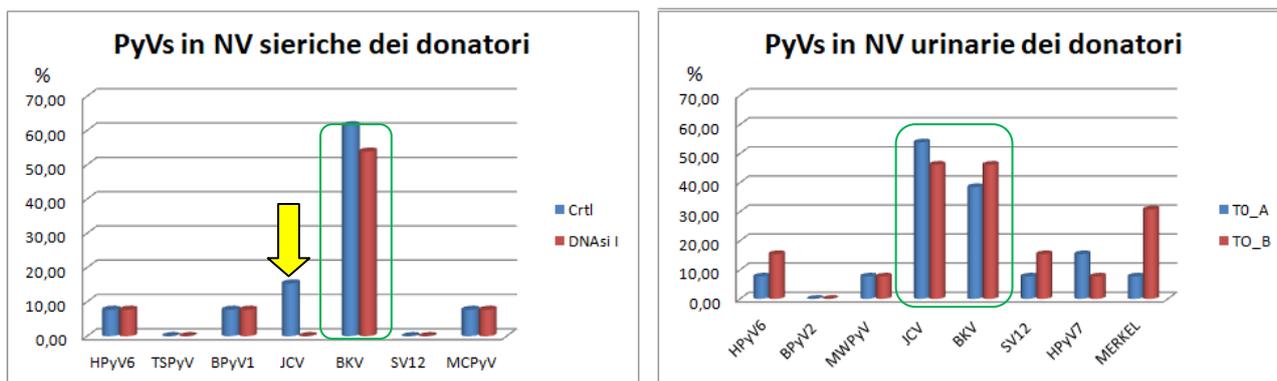


Figura 35 –I genomi virali dei PyVs nelle NV dei donatori

I dati sulla presenza dei genomi virali nelle NV sieriche e urinarie evidenziano come la DNAsi I è capace di digerire solo in minima parte i genomi virali. Tale dato è riferibile al fatto che essi possano essere contenuti nelle NV o in strutture di simili dimensioni copurificate con esse, ovvero particelle virali. A ciò fa eccezione il genoma virale del JCV. Infatti, nelle NV sieriche, la DNAsi I digerisce completamente il DNA virale, e questo potrebbe significare che il DNA rilevato è DNA libero, associato esternamente alle NV e quindi accessibile alla DNAsi I.

I genomi virali della famiglia dei Papillomavirus umani nei donatori, invece, evidenzia delle positività isolate e poco ricorrenti nella casistica testata. Questa tendenza riguarda sia le NV isolate dal siero che quelli urinari. Entrambi, inoltre, sembrano non risentire affatto del trattamento enzimatico effettuato con la DNAsi I (Tabella 17 -Tabella 17).

HPV da esosomi sierici dei donatori non trattati							
Timing	HPV53	HPV16	HPV73	HPV18	HPV33	HPV31	HPV52
T0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T1	7,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T2	0,00	0,00	0,00	8,33	0,00	0,00	8,33
T3	0,00	0,00	0,00	15,38	0,00	0,00	0,00
T4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

HPV da esosomi urinari dei donatori non trattati								
Timing	HPV53	HPV16	HPV73	HPV45	HPV59	HPV18	HPV33	HPV31
T0	7,69	0,00	0,00	0,00	7,69	0,00	0,00	0,00
T1	15,38	0,00	0,00	7,69	7,69	0,00	0,00	0,00
T2	0,00	0,00	8,33	0,00	0,00	16,67	0,00	0,00
T3	0,00	0,00	0,00	8,33	0,00	8,33	0,00	0,00
T4	0,00	0,00	0,00	7,69	7,69	0,00	0,00	7,69

HPV da esosomi sierici dei donatori trattati con DNAsi I							
Timing	HPV53	HPV16	HPV73	HPV18	HPV33	HPV31	HPV52
T0	0,00	7,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T2	0,00	0,00	0,00	25,00	0,00	0,00	0,00
T3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T4	0,00	7,69	7,69	0,00	7,69	7,69	0,00

HPV da esosomi urinari dei donatori trattati con DNAsi I								
Timing	HPV53	HPV16	HPV73	HPV45	HPV59	HPV18	HPV33	HPV31
T0	7,69	0,00	0,00	0,00	7,69	0,00	0,00	0,00
T1	7,69	0,00	0,00	0,00	7,69	0,00	7,69	0,00
T2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,33	8,33	0,00
T3	0,00	0,00	8,33	8,33	0,00	0,00	0,00	0,00
T4	0,00	7,69	0,00	7,69	7,69	15,38	0,00	0,00

Tabella 17 - Cinetica infettiva dei genomi virali degli HPV rilevati in NV sieriche trattati (rosso) e non (blu). I numeri si riferiscono alle percentuali di positività identificate per ogni genoma virale.

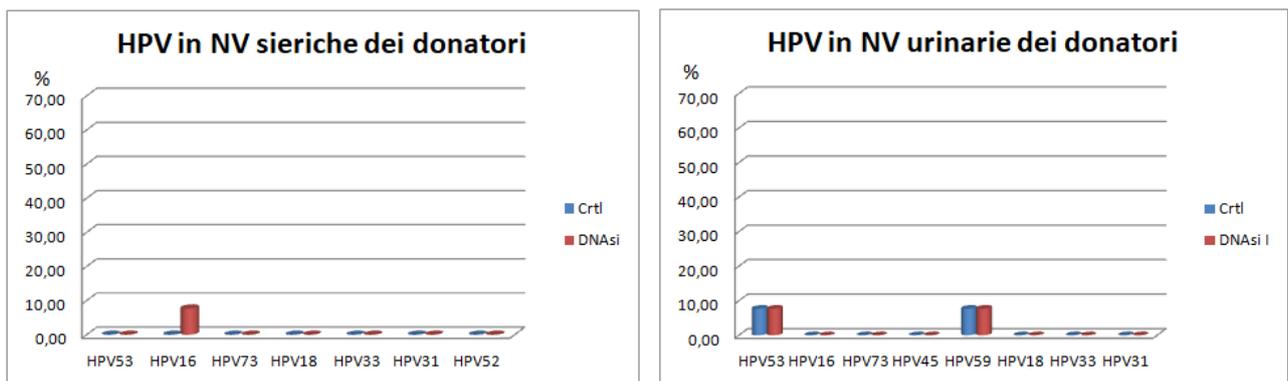


Figura 36 – I genomi virali degli HPV nelle NV dei donatori

4.5. I PyVs nei pazienti trapiantati

I genomi virali risultati negativi sull'intera casistica sono:

- ❖ 10 genotipi su 18 nei campioni di esosomi sierici: KIPyV, BPyV3, mPyV, MWPyV, WUPyV, EPyV, SV40, HPyV7, HPyV9, HPyV12;
- ❖ 8 genotipi su 18 nei campioni di esosomi urinari: KIPyV, BPyV1,3, MWPyV, WUPyV, EPyV, HPyV9, HPyV12.

4.5.1. La cinetica delle infezioni da PyVs

I genomi virali rilevati sono:

- ❖ negli esosomi sierici lo HPyV6, la TSPyV, il BPyV1, il BPyV2, il JCV, il BKV, l'SV12 e il MCPyV;
- ❖ negli esosomi urinari lo HPyV6, la TSPyV, il MPyV, il BPyV2, l'SV40, il JCV, il BKV, l'SV12, lo HPyV7 e il MCPyV.

La Tabella 18 mostra la percentuale dei pazienti positivi ai genomi virali individuate e il relativo comportamento delle stesse quando digerite con DNAsi I.

PyVs da esosomi sierici dei trapiantati non trattati								
Timing	HPyV6	TSPyV	BPyV1	BPyV2	JCV	BKV	SV12	MCPyV
T0	4,76	1,59	3,17	3,17	12,70	23,81	3,17	19,05
T1	1,59	1,59	1,59	0,00	15,87	30,16	6,35	14,29
T2	6,78	0,00	0,00	3,39	3,39	23,73	16,95	13,56
T3	3,28	0,00	0,00	1,64	0,00	24,59	14,75	11,48
T4	4,69	0,00	0,00	0,00	1,56	14,06	10,94	9,38

PyVs da esosomi urinari dei trapiantati non trattati										
Timing	HPyV6	TSPyV	MPyV	BPyV2	SV40	JCV	BKV	SV12	HPyV7	MCPyV
T0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
T1	14,29	0,00	1,59	0,00	0,00	22,22	34,92	7,94	6,35	20,63
T2	15,25	1,69	0,00	0,00	1,69	18,64	38,98	13,56	0,00	16,95
T3	16,39	0,00	0,00	0,00	0,00	24,59	39,34	11,48	0,00	22,95
T4	7,94	1,59	0,00	0,00	0,00	28,57	22,22	11,11	4,76	22,22

PyVs da esosomi sierici dei trapiantati trattati con DNAsi I								
Timing	HPyV6	TSPyV	BPyV1	BPyV2	JCV	BKV	SV12	MCPyV
T0_B	15,87	1,59	0,00	1,59	0,00	36,51	12,70	11,11
T1_B	6,35	0,00	0,00	0,00	0,00	28,57	6,35	9,52
T2_B	6,78	0,00	1,69	1,69	0,00	40,68	11,86	10,17
T3_B	4,92	0,00	0,00	0,00	0,00	27,87	6,56	8,20
T4_B	3,13	0,00	0,00	0,00	0,00	23,44	18,75	12,50

PyVs da esosomi urinari dei trapiantati trattati con DNAsi I										
Timing	HPyV6	TSPyV	MPyV	BPyV2	SV40	JCV	BKV	SV12	HPyV7	MCPyV
T0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
T1	9,52	0,00	0,00	0,00	0,00	14,29	28,57	9,52	3,17	12,70
T2	5,08	0,00	0,00	1,69	0,00	18,64	33,90	11,86	1,69	13,56
T3	9,84	0,00	0,00	0,00	0,00	19,67	34,43	11,48	0,00	9,84
T4	3,17	0,00	0,00	0,00	0,00	22,22	34,92	11,11	3,17	15,87

Tabella 18 – Cinetica dei genomi virali identificati negli HPV in esosomi sierici e urinari trattati (rosso) e non (blu). I numeri riportati in tabella si riferiscono alle percentuali di positività per ciascun genoma virale.

Come osservato nei donatori, il DNA dei genomi virali dei PyVs si mostra DNAsi I resistente (Tabella 18), sia nel siero che nelle urine, eccezion fatta per il genoma virale del JCV nelle NV sieriche ma non urinarie. Ciò suggerisce che la natura di questi DNA non sia relativa a materiale circolante ma contenuto, o quanto meno protetto, dalle NV sieriche e urinarie, rispettivamente.

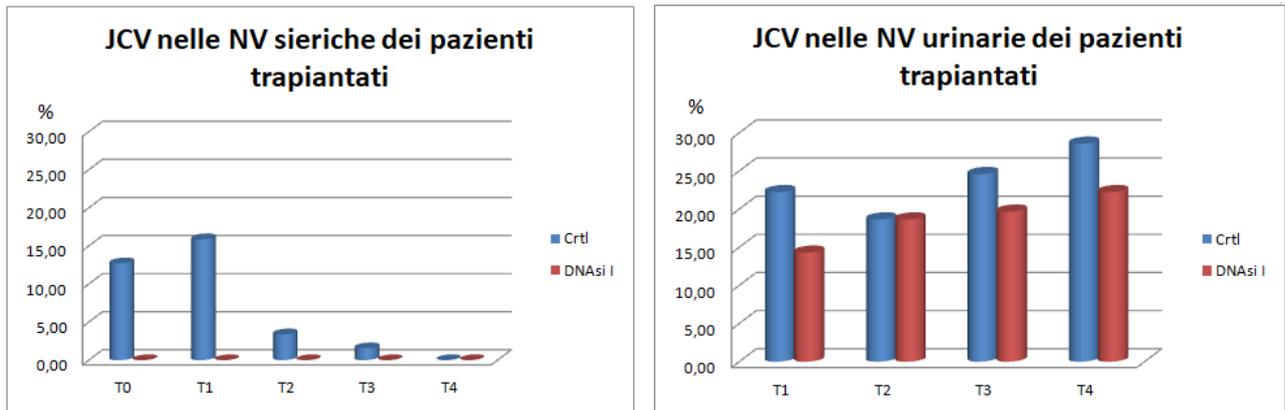


Figura 37 – il genoma del JCV nelle NV isolate attraverso PEG

Ciò si conferma sia pre trapianto (T0) che nelle fasi post trapianto (da T1 a T3).

Infine, è interessante notare come nel confronto fra donatori e riceventi, la percentuale dei soggetti positivi per il genoma virale del JCV è sostanzialmente identica, come testimoniato dal test di Fisher ($p > 0.05$) e si assesta intorno al 15% (Figura 38). Quindi, le positività riscontrate non sono strettamente correlate allo status di donatore piuttosto che ricevente.

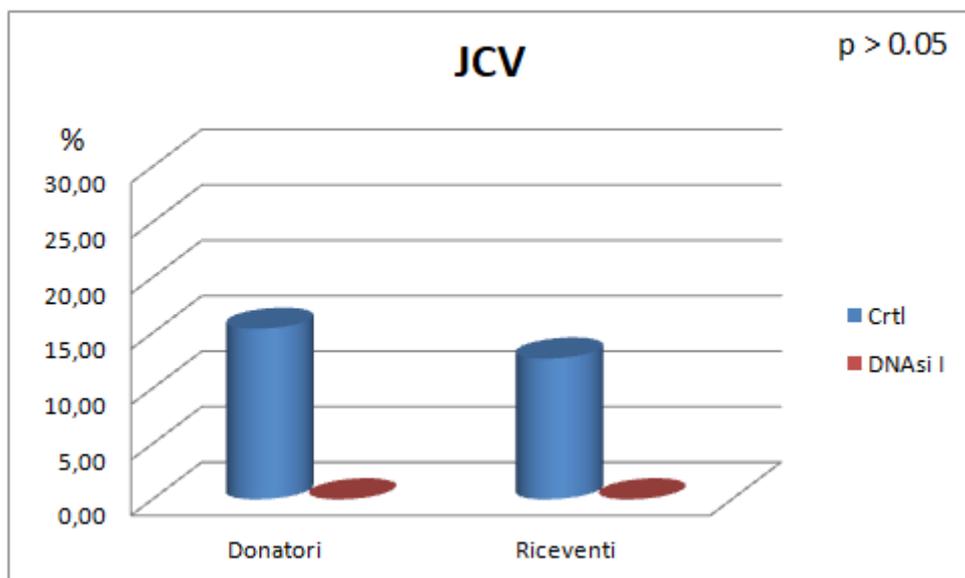


Figura 38 – Confronto donatori e riceventi

4.6. Separazione immunomagnetica

Poiché il marcatore esosomiale CD9 è altamente rappresentato nelle NV sieriche e urinarie, è stata utilizzata una metodica di isolamento esosomiale, ovvero la separazione immunomagnetica che utilizza biglie magnetiche coniugate con un anticorpo anti-CD9.

A tal fine, sono state scelte due coppie di pazienti, sottoposte al trapianto da donatore vivente (DON3, RIC3; DON4, RIC4), nelle quali si è riscontrata la maggior varietà di genomi virali. L'analisi è stata estesa a tutti i 5 campionamenti effettuati per ciascun paziente (20 campioni), sia per il siero sia per l'urina (40 campioni), prendendo in considerazione la frazione CD9 negativa (in cui ricadono eventuali particelle virali) e quella CD9 positiva (in cui si collocano gli esosomi) (80 campioni), con il conseguente trattamento enzimatico con la DNAsi I (160 campioni). Come è facile intuire dal considerevole numero dei campioni ottenuti considerando le variabili inserite nello studio (metodica di isolamento, diverso tipo di campione biologico e trattamento enzimatico), non è stato possibile estendere questo tipo di analisi a tutta la casistica.

Le Tabella 19, Tabella 20, Tabella 21, Tabella 22 riportate mostrano il confronto delle positività dei genomi virali per i PyVs. L'analisi prende in considerazione le due metodiche di isolamento e le modificazioni in relazione al trattamento enzimatico.

PyVs negli esosomi sierici: confronto isolamento											
DON_A	TO					DON_B	TO				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	50	50	0	50	0	es_a	100	0	0	100	0
cd9-_a	0	50	100	0	50	cd9-_a	0	0	0	0	0
cd9+_a	0	0	0	50	0	cd9+_a	0	0	0	50	0
	T1						T1				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	0	50	0	50	0	es_a	50	0	50	100	0
cd9-_a	0	50	50	0	0	cd9-_a	0	0	0	0	0
cd9+_a	50	0	0	50	0	cd9+_a	0	0	0	50	0
	T2						T2				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	0	0	50	50	0	es_a	50	0	0	100	0
cd9-_a	0	0	0	0	0	cd9-_a	50	0	0	0	0
cd9+_a	0	0	0	0	0	cd9+_a	0	0	50	50	0
	T3						T3				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	100	50	50	50	0	es_a	50	0	0	0	0
cd9-_a	0	50	0	0	0	cd9-_a	0	0	0	0	0
cd9+_a	50	0	0	50	0	cd9+_a	0	0	0	0	0
	T4						T4				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	0	50	0	50	0	es_a	0	0	0	50	0
cd9-_a	0	50	0	0	0	cd9-_a	0	0	50	0	0
cd9+_a	50	0	0	0	50	cd9+_a	0	0	0	0	0

Tabella 19 – Confronto dell'isolamento esosomiale da siero con PEG e separazione immunomagnetica nei donatori. I numeri si riferiscono alle percentuali dei genomi virali positivi

PyVs negli esosomi urinari: confronto isolamento

DON_A	TO					DON_B	TO				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	50	50	0	50	0	es_a	50	50	0	50	50
cd9-_a	0	0	0	0	0	cd9-_a	50	0	0	0	0
cd9+_a	0	0	0	50	0	cd9+_a	0	0	100	50	0
	T1						T1				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	50	50	50	0	0	es_a	0	50	0	0	50
cd9-_a	0	0	0	0	0	cd9-_a	0	50	50	0	0
cd9+_a	0	0	0	0	0	cd9+_a	0	0	50	50	0
	T2						T2				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	0	50	50	50	50	es_a	100	50	0	0	0
cd9-_a	0	0	0	0	0	cd9-_a	0	0	0	0	0
cd9+_a	0	0	0	50	0	cd9+_a	0	0	0	0	0
	T3						T3				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	100	50	0	50	0	es_a	50	50	50	50	50
cd9-_a	0	0	0	0	0	cd9-_a	0	0	0	0	0
cd9+_a	0	0	0	50	0	cd9+_a	50	0	0	50	0
	T4						T4				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	0	50	0	0	50	es_a	0	50	50	50	0
cd9-_a	50	0	0	0	0	cd9-_a	50	0	0	0	0
cd9+_a	0	0	0	50	0	cd9+_a	0	0	0	50	0

Tabella 20 - Confronto dell'isolamento esosomiale da urina con PEG e separazione immunomagnetica nei donatori. I numeri si riferiscono alle percentuali dei genomi virali positivi

PyVs negli esosomi sierici: confronto isolamento

RIC_A	TO					RIC_B	TO				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	50	50	0	50	0	es_a	50	0	50	100	50
cd9-_a	0	50	0	0	0	cd9-_a	0	0	0	0	0
cd9+_a	50	0	0	50	0	cd9+_a	0	0	0	100	0
	T1						T1				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	0	50	0	50	0	es_a	50	0	50	100	0
cd9-_a	50	0	0	0	0	cd9-_a	0	0	0	0	0
cd9+_a	50	0	0	50	0	cd9+_a	0	0	0	100	0
	T2						T2				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	50	50	0	50	50	es_a	100	0	0	0	50
cd9-_a	0	50	0	0	0	cd9-_a	0	0	0	0	0
cd9+_a	0	0	0	50	0	cd9+_a	0	0	0	50	0
	T3						T3				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	100	0	0	0	50	es_a	100	0	50	0	0
cd9-_a	50	50	0	0	0	cd9-_a	0	0	0	0	50
cd9+_a	0	0	0	0	0	cd9+_a	0	0	0	0	0
	T4						T4				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	50	0	0	50	0	es_a	0	0	0	50	0
cd9-_a	0	0	0	0	0	cd9-_a	0	0	50	0	0
cd9+_a	0	0	0	50	0	cd9+_a	0	0	0	50	0

Tabella 21 – Confronto dell'isolamento esosomiale da siero con PEG e separazione immunomagnetica nei trapiantati. . I numeri si riferiscono alle percentuali dei genomi virali positivi

PyVs negli esosomi urinari: confronto isolamento											
RIC_A	TO					RIC_B	TO				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	50	0	0	0	50	es_a	0	0	0	50	0
cd9-_a	50	0	0	0	0	cd9-_a	0	0	0	0	0
cd9+_a	0	0	100	0	0	cd9+_a	0	0	50	0	0
	T1						T1				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	0	50	0	50	50	es_a	100	50	50	50	50
cd9-_a	0	0	50	0	0	cd9-_a	50	0	0	0	0
cd9+_a	0	100	50	50	0	cd9+_a	0	0	0	0	0
	T2						T2				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	100	50	0	0	0	es_a	50	50	50	50	0
cd9-_a	0	0	0	0	0	cd9-_a	0	0	0	0	0
cd9+_a	0	100	0	0	0	cd9+_a	0	0	0	0	0
	T3						T3				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	50	50	50	0	50	es_a	100	50	0	0	0
cd9-_a	0	0	0	0	0	cd9-_a	50	0	0	0	0
cd9+_a	50	50	0	0	0	cd9+_a	0	0	0	0	0
	T4						T4				
	BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV		BKV	JCV	HPyV6	SV12	MCPyV
es_a	0	50	50	50	0	es_a	50	50	50	50	0
cd9-_a	50	0	0	0	0	cd9-_a	0	0	0	0	0
cd9+_a	0	50	0	50	0	cd9+_a	0	0	0	0	0

Tabella 22 - Confronto dell'isolamento esosomiale da urina con PEG e separazione immunomagnetica nei trapiantati. I numeri si riferiscono alle percentuali dei genomi virali positivi

Il trattamento enzimatico acquisisce una valenza differente a seconda della frazione (CD9 negativa e CD9 positiva) sulla quale viene effettuata (Figura 39):

- ❖ I genomi virali che ricadono nelle vescicole CD9 positive (esosomi) non trattate con DNAsi I, identificano un DNA associato agli esosomi, per il quale non è possibile determinare se le specie virali siano contenute all'interno o all'esterno degli stessi;
- ❖ I genomi virali, rilevati nelle vescicole CD9 positive che resistono al trattamento con DNAsi I, si riferiscono a specie virali verosimilmente contenute all'interno degli esosomi;
- ❖ I genomi virali, identificati nella frazione CD9 negativa non trattata, si associano a *cell free DNA* associati esternamente e pertanto accessibili all'azione delle DNAsi ;
- ❖ I genomi virali, individuati nella frazione CD9 negativa resistenti al trattamento enzimatico, sono probabilmente relativi a particelle virali circolanti DNAsi I resistenti.

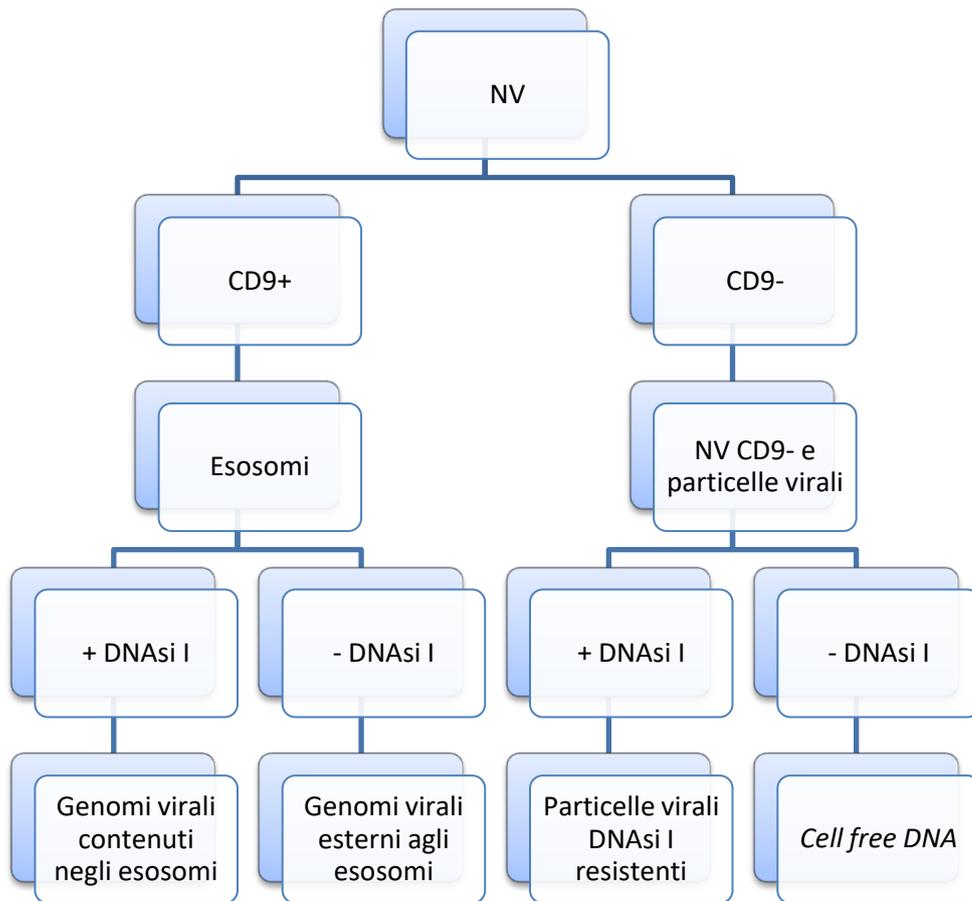


Figura 39 - Dalle NV agli esosomi

4.7. Il genoma virale del JCV

Dal confronto dei differenti metodi, è emerso che il genoma virale di JCV mostra un pattern riproducibile e coerente con quanto precedentemente osservato con il PEG, ovvero che il suo DNA sia assente all'interno della frazione esosomiale (CD9+ resistenti al trattamento enzimatico). Il suo genoma, infatti, appare essere completamente sensibile all'azione della DNase I nel siero. Lo stesso non accade nelle urine in cui, pare essere associato agli esosomi (Figura 40).

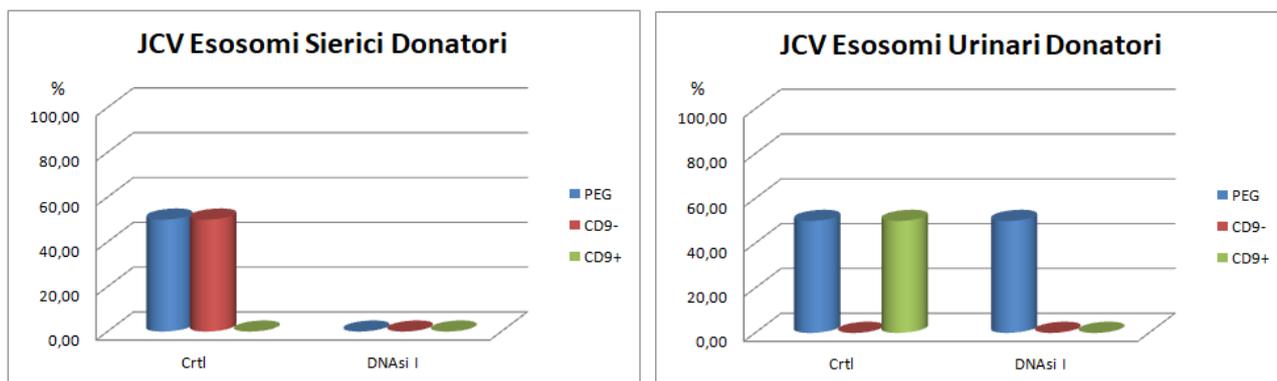


Figura 40 – Confronto metodiche di isolamento e trattamento per il genoma virale del JCV nei donatori

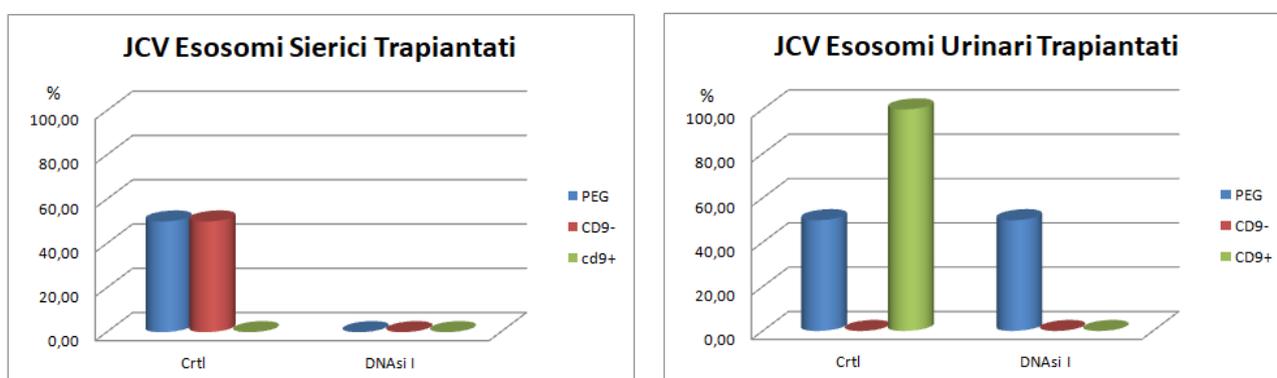


Figura 41 - Confronto metodiche di isolamento e trattamento per il genoma virale del JCV nei trapiantati

Inoltre, quanto ipotizzato e descritto si conferma sia quando consideriamo i soggetti donatori (sani) sia i pazienti sottoposti a trapianto renale, con la sola differenza dovuta a una maggiore frequenza della rilevazione del genoma virale negli esosomi urinari dei trapiantati (Figura 41).

4.8. Il genoma virale dell'SV12

Così come per il genoma virale del JCV, anche il genoma virale di SV12 conferma il dato emerso al termine della analisi della frazione nanovescolare isolata con il PEG. Il genoma virale SV12 appare non solo associata agli esosomi (come documentato dalla positività nella frazione CD9+ di controllo e quindi non trattata), ma anche contenuta all'interno degli esosomi stessi, in quanto resistente alla DNAsi I (come emerge dalla resistenza al trattamento enzimatico nella frazione CD9+) (Figura 42).

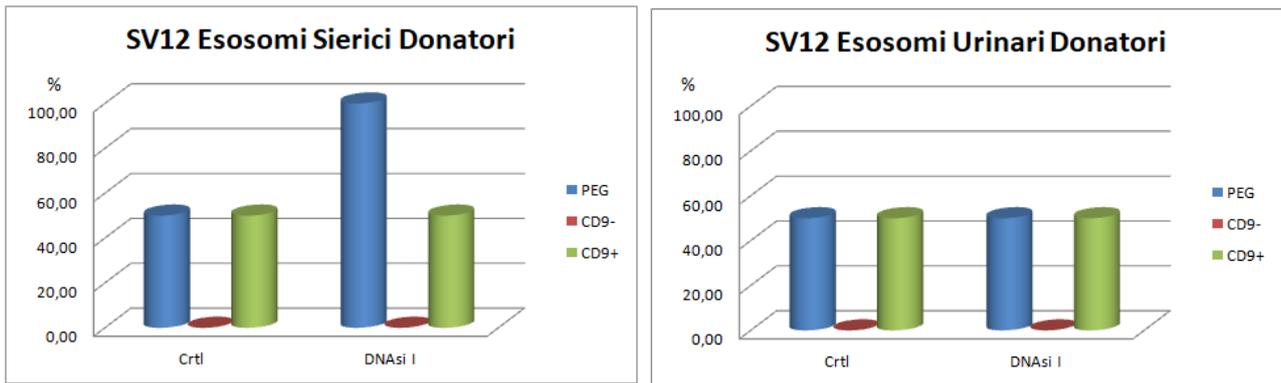


Figura 42 - Confronto metodiche di isolamento e trattamento per il genoma virale del SV12 nei donatori

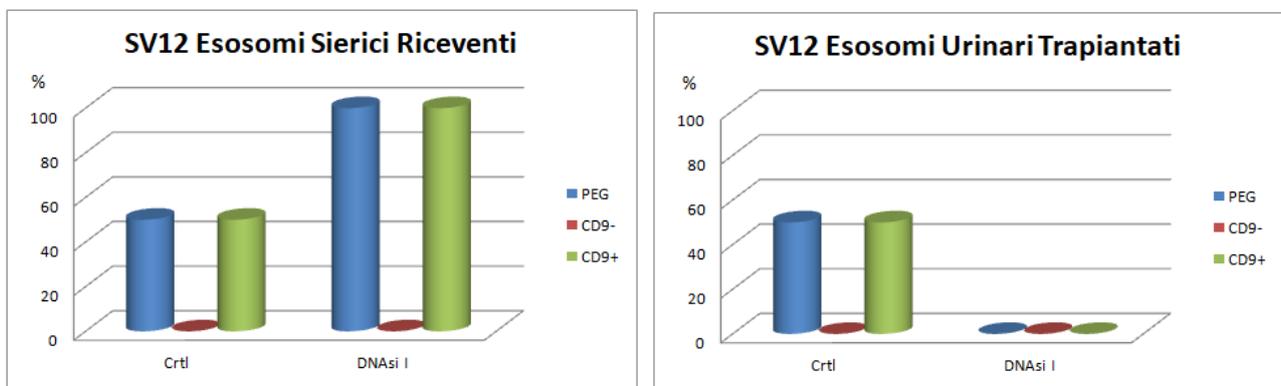


Figura 43 - Confronto metodiche di isolamento e trattamento per il genoma virale del SV12 nei trapiantati

Tale pattern mantiene la sua coerenza anche variando i soggetti in analisi, donatori e riceventi (Figura 43), e mantiene la sua riproducibilità se si considera tutta la cinetica dell'infezione (Tabella 21 e Tabella 22).

4.9. Gli HPV mucosali nei trapiantati

I genomi virali negativi sull'intera casistica sono:

- ❖ 6 specie virali su 16 nei campioni negli esosomi sierici: HPV66, HPV45, HPV56, HPV51, HPV52, HPV35;
- ❖ Nessuno dei genomi virali negli esosomi urinari.

4.9.1. La cinetica infettiva degli HPV

I genomi virali rilevati sono:

- ❖ Negli esosomi sierici, gli HPV53,39,16,58,73,59,68,18,33 e 31 (Tabella 23).

HPV da NV sieriche dei riceventi non trattati con DNAsi I										
Timing	HPV53	HPV39	HPV16	HPV58	HPV73	HPV59	HPV68	HPV18	HPV33	HPV31
T0	1,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,94	0,00	0,00
T1	0,00	0,00	1,59	1,59	0,00	1,59	1,59	7,94	0,00	0,00
T2	0,00	1,69	0,00	0,00	1,69	0,00	1,69	6,78	0,00	0,00
T3	4,92	1,64	0,00	0,00	3,28	0,00	0,00	6,56	1,64	0,00
T4	0,00	0,00	1,56	0,00	0,00	0,00	0,00	3,13	1,56	0,00

HPV da NV sieriche dei riceventi trattati con DNAsi I										
Timing	HPV53	HPV39	HPV16	HPV58	HPV73	HPV59	HPV68	HPV18	HPV33	HPV31
T0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,35	0,00	1,59
T1	3,17	0,00	0,00	0,00	1,59	1,59	0,00	7,94	1,59	0,00
T2	1,69	3,39	0,00	0,00	1,69	1,69	0,00	10,17	0,00	0,00
T3	0,00	0,00	1,64	1,64	0,00	0,00	0,00	3,28	3,28	0,00
T4	1,56	0,00	0,00	0,00	4,69	0,00	0,00	1,56	0,00	0,00

Tabella 23 – Cinetica infettiva dei genomi virali degli HPV rilevati in NV sieriche trattati (rosso) e non (blu). I numeri si riferiscono alla percentuale dei genomi virali rilevati

❖ Negli esosomi urinari, tutti quelli inclusi nel design 2 (Tabella 24)

HPV da NV urinarie dei riceventi non trattati																
Timing	HPV53	HPV66	HPV39	HPV16	HPV58	HPV73	HPV45	HPV59	HPV56	HPV68	HPV18	HPV33	HPV31	HPV51	HPV52	HPV35
T1	3,17	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00	3,17	3,17	0,00	0,00	4,76	0,00	1,59	0,00	3,17	1,59
T2	6,78	1,69	3,39	3,39	0,00	1,69	3,39	3,39	1,69	0,00	10,17	0,00	1,69	3,39	3,39	1,69
T3	4,92	0,00	3,28	3,28	0,00	0,00	1,64	3,28	1,64	1,64	6,56	3,28	1,64	0,00	3,28	0,00
T4	4,76	3,17	3,17	1,59	0,00	1,59	3,17	4,76	0,00	1,59	3,17	4,76	1,59	1,59	1,59	1,59

HPV da NV urinarie dei riceventi trattati con DNAsi I																
Timing	HPV53	HPV66	HPV39	HPV16	HPV58	HPV73	HPV45	HPV59	HPV56	HPV68	HPV18	HPV33	HPV31	HPV51	HPV52	HPV35
T1	1,59	0,00	0,00	1,59	1,59	0,00	0,00	0,00	0,00	1,59	6,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T2	5,08	0,00	1,69	5,08	0,00	1,69	0,00	3,39	0,00	0,00	3,39	0,00	1,69	0,00	1,69	0,00
T3	3,28	0,00	4,92	1,64	1,64	1,64	1,64	3,28	0,00	0,00	3,28	0,00	1,64	0,00	1,64	0,00
T4	3,17	0,00	3,17	3,17	0,00	1,59	3,17	3,17	0,00	1,59	1,59	3,17	1,59	0,00	1,59	0,00

Tabella 24 - Cinetica infettiva dei genomi virali degli HPV rilevati in esosomi urinari trattati (rosso) e non (blu). I numeri si riferiscono alla percentuale dei genomi virali rilevati

Purtroppo, così come riscontrato nei donatori, il numero di campioni positivi ai singoli genomi virali è nettamente inferiore se paragonati ai PyVs, sia nelle NV sieriche che in quelle urinarie. Probabilmente, le infezioni da HPV mucosali, seppur presenti nei pazienti trapiantati, non circolano con la stessa facilità dei Poliomavirus.

La Figura 44 mostra la cinetica infettiva per il genoma virale dell'HPV18, l'unico che circola nel 10% dei pazienti trapiantati, mentre nei controlli sani è assente (Figura 36)).

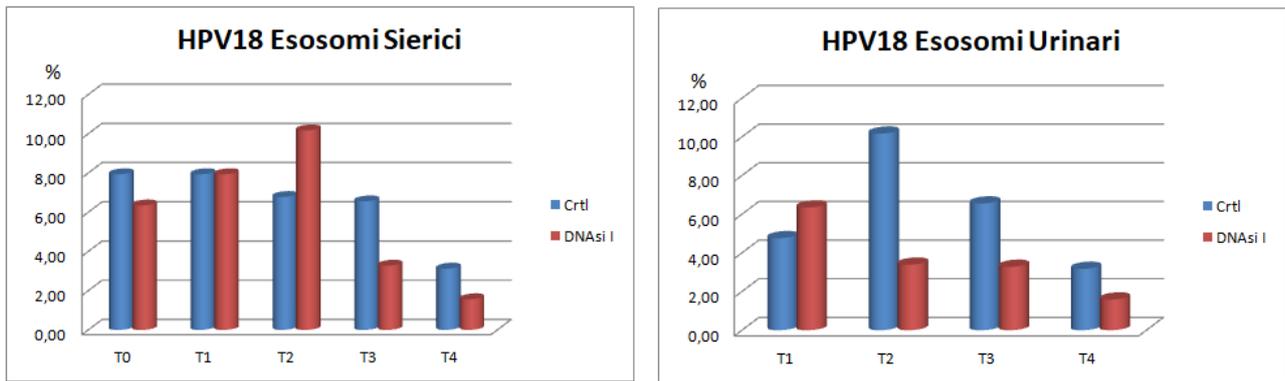


Figura 44 - Esosomi sierici HPV18 positivi

La cinetica del genoma virale ha evidenziato fluttuazioni minime a seguito del trattamento enzimatico, che sembrano mostrare una certa resistenza alla DNAsi I.

La stessa analisi effettuata mediante separazione immunomagnetica, non ha evidenziato nessuna variazione rispetto ai pochi dati ottenuti con il PEG.

5. Discussione

Il trapianto è sempre più una terapia consolidata per molte malattie d'organo in fase terminale, fra cui l'End Stage Kidney Disease (ESKD). I progressi delle tecniche chirurgiche e l'evoluzione della terapia immunosoppressiva hanno indubbiamente migliorato i tassi di sopravvivenza, ma le infezioni post-trapianto continuano a causare morbilità e mortalità in questi pazienti [135]. Il rischio infettivo post-trapianto è generalmente determinato dall'equilibrio tra due fattori: lo stato d'immunosoppressione del paziente e l'esposizione epidemiologica: come conseguenza, la profilassi antimicrobica e il trattamento preventivo sono strategie mirate ai primi 6 mesi post trapianto. Tuttavia, alcune evidenze suggeriscono che i cambiamenti degli stessi immunosoppressori e dei regimi di profilassi hanno alterato la prevedibilità dei contagi post-trapianto, causando infezioni successive dovute a agenti virali, fungini e da altri patogeni opportunisti [136]. Anche se il rischio d'infezione diminuisce 6 mesi dopo il trapianto, ci sono poche ricerche che descrivono la clinica e le caratteristiche microbiologiche delle complicanze infettive tardive in questi pazienti.

Gli esosomi, vescicole nanometriche rilasciate dalla maggior parte delle cellule presenti nei vari fluidi biologici, possono trasferire il loro carico di proteine e acidi nucleici alle cellule riceventi, agendo come un vero e proprio mezzo di comunicazione intercellulare [134]. Essi, quindi, sono potenzialmente in grado di trasferire anche i genomi virali fra le cellule adiacenti, come descritto in letteratura per il genoma di HBV, HCV e HPV [137-139].

Lo scopo di questo progetto è stato quello di valutare la presenza di genomi virali associati a nano vescicole in 72 pazienti sottoposti a trapianto renale, monitorando attraverso 5 prelievi seriali di sangue e urina il primo anno successivo all'intervento. L'individuazione dei genomi virali è stata effettuata attraverso la messa a punto di un protocollo per la determinazione delle specie virali, basato sulla spettrometria di massa MALDI- TOF.

I genomi virali scelti appartengono alle famiglie dei Polyomavirus (PyVs) e dei Papillomavirus umani (HPV). La scelta di queste famiglie virali è dipesa dalla capacità di questi virus di provocare o gravi malattie nei trapiantati di rene, come nel caso dei PyVs (i.e. Nefropatia da BKV, Leucoencefalopatia multifocale progressiva da JCV) oppure di rappresentare un potenziale rischio oncogeno (HPV). Sono state così allestite due plex di indagine separate: una per 18 PyVs e una per 16 HPV. Ciascuna plex contiene per ogni genoma virale una coppia di primers da PCR per l'amplificazione iniziale e un primer per l'estensione a singolo nucleotide specifico per il singolo genoma virale in analisi. Per la scelta dei primers, si è intervenuti su regioni specifiche dei genomi virali (Large T Antigen) e si è scelta una base dando origine ad un "allele dummy" sfruttando così la capacità dello strumento di discriminare l'allele A piuttosto che l'allele B. L' "Allele Dummy" è stato pertanto generato arbitrariamente dall'operatore, previa verifica dell'assenza di isolati genetici associati a quella posizione per quel genoma virale, in NCBI. La specificità dei primers generati, inoltre, è stata controllata mediante algoritmi informatici (PrimerBlast). L'assenza di ampliconi generati su DNA genomico e sull'intero Taxa dei virus, ad eccezione del genoma virale desiderato, ha assicurato una amplificazione specifica per ciascun genoma virale. Durante l'analisi di massa quindi, quando il detector ha identificato la massa relativa all' "Allele Dummy",

inesistente in realtà, eravamo di fronte ad un campione negativo, viceversa la chiamata “wild type” corrispondeva alla reale presenza del genoma virale nel campione, come descritto da Cricca e colleghi [140].

La spettrometria di massa essendo una metodica high-throughput ha consentito quindi, la contemporanea rilevazione dei 18 genomi virali per i PyV e dei 16 HPV per ciascun campione sottoposto ad analisi. Inoltre, l’inserimento di replicati sperimentali nei vari esperimenti ha assicurato il monitoraggio dell’effettiva riproducibilità del metodo creato.

Nei soggetti reclutati, donatori e riceventi, è stato effettuato l’isolamento delle NV in campioni di siero e urina utilizzando una metodica di precipitazione basata sul polietilenglicole (PEG). Ad oggi, la metodica di isolamento considerata come gold standard è l’ultracentrifugazione ma le diverse ore di lavoro richieste, gli elevati volume di campione di partenza necessari e l’ampia casistica raccolta ne hanno reso la sua applicazione impossibile. Di contro, la relativa rapidità e la quantità di materiale di partenza inferiore richiesti dall’isolamento con il PEG rispetto all’ultracentrifugazione, ha imposto l’incognita delle copurificazioni indesiderate. Il PEG infatti, effettuando una precipitazione dimensionale espone al rischio di copurificare particelle che si collocano nel medesimo range dimensionale degli esosomi e che possono rappresentare degli artefatti per le successive rilevazioni effettuate con lo spettrometro di massa. Pertanto, la caratterizzazione della quantità e del fenotipo delle NV così isolate è stata verificata mediante NTA e attraverso il MACSplex.

L’analisi NTA ha confermato che le NV isolate sono in linea con i dati riportati in letteratura per quanto concerne sia il numero (10^{12} - 10^{13} per le NV sieriche e 10^9 - 10^{10} per quelle urinarie) che le dimensioni (75-198nm) delle NV sieriche e urinarie. Inoltre, la successiva analisi dei 37 epitopi nanovesicolari ed esosomiali ha evidenziato l’abbondante presenza dell’antigene CD9 sulla superficie delle NV sieriche e urinarie dei soggetti testati. In particolare, in tutti i campioni di NV urinarie indagati, oltre alla spiccata presenza dell’antigene CD9, sono emersi anche gli antigeni CD63 e CD81, comunemente associati ad esosomi. Questo dimostra un arricchimento della frazione esosomiale nelle NV urinarie isolate. Tali vescicole inoltre, esprimevano alti livelli dell’antigene CD133/1, descritto da Bussolati come possibile marker per il monitoraggio dell’evoluzione del trapianto renale [141].

Inoltre, l’utilizzo della digestione enzimatica mediata da DNAsi I ha permesso di testare quanto potesse essere aspecifica la rilevazione dei genomi virali identificati con la spettrometria di massa, qualora si palesassero delle copurificazioni inattese. L’analisi dei genomi virali è stata così condotta in parallelo testando i medesimi campioni trattati con DNAsi I e non. I risultati ottenuti sulla corte dei soggetti donatori e dei pazienti trapiantati hanno messo in luce, delle percentuali di positività spiccate per il genoma virale del BKV (60%) e del JCV (20%) nelle NV sieriche ma soprattutto in quelle urinarie (50% entrambi). La presenza di questi virus e con queste percentuali si allinea alla letteratura disponibile ad oggi secondo la quale le infezioni da PyVs interessano la popolazione sin dalla tenera età con cicli di infezione e reinfezione continui, intervallati dalla fase di latenza.

L'aspetto innovativo dei dati sin qui descritti è rappresentato dal fatto che se in letteratura sono ormai note molteplici associazioni fra virus e NV, poco si sa sui genomi virali associati o contenuti all'interno delle stesse. Inoltre la cinetica di queste positività tende a mantenersi nel periodo di osservazione testato e ad essere solo parzialmente sensibile al trattamento di digestione enzimatica con la DNAsi I.

Questo dato depone a favore dell'ipotesi che i genomi virali identificati possano o essere contenuti nelle NV oppure in strutture di simile dimensione copurificate con esse, ovvero particelle virali complete.

Sulla base dei risultati di genotipizzazione descritti, la metodica di isolamento delle NV acquisisce un ruolo cruciale nel determinare la presunta collocazione dei genomi virali identificati.

Per dirimere quale potesse essere l'esatta collocazione dei genomi virali isolati e basandoci sull'abbondante presenza dell'antigene CD9 identificato nelle NV sieriche e urinarie, è stata utilizzata una metodica di isolamento specifica per la frazione esosomiale, ovvero la separazione immunomagnetica, basata su biglie magnetiche coniugate con l'anticorpo anti-CD9. Tale metodica separa due frazioni, quella CD9 negativa (in cui ricadono le particelle virali) e quella CD9 positiva (in cui ricadono gli esosomi). Il trattamento enzimatico con DNAsi I in entrambe le frazioni e il confronto incrociato dei dati emersi dalla determinazione dei genomi virali identificati in NV isolate con il PEG, ha permesso quindi di stabilire che solo i genomi virali rilevati nella frazione CD9 positiva e resistenti alla digestione enzimatica, sono collocabili all'interno degli esosomi. Quelli rilevati nella frazione CD9 positiva ma DNAsi I sensibili, si riferiscono a genomi virali associati agli esosomi per i quali non è possibile determinare se le specie virali siano contenute all'interno o all'esterno delle stesse. I genomi virali identificati nella frazione CD9 negativa non trattata invece, identificano *cell free DNA* collocati sicuramente all'esterno delle NV e che pertanto possono essere accessibili all'azione parziale o totale delle DNAsi. In ultimo, i genomi virali riscontrati nella frazione CD9 negativa resistenti al trattamento con la DNAsi I sono probabilmente relativi a particelle virali circolanti.

Basandoci sulla classificazione appena descritta, derivata dalle osservazioni condotte in questo studio, e incrociando i dati ottenuti con le due metodiche di isolamento (PEG e separazione immunomagnetica), è spiccata la presenza del virus SV12 nella frazione CD9 positiva e resistente al trattamento enzimatico, sia in esosomi sierici che urinari, con un pattern riproducibile anche quando si considera la cinetica infettiva di tutti i campionamenti intercorsi durante il follow up dei soggetti reclutati. Inoltre, tale riscontro non è influenzato dallo status di donatore o ricevente ma si rileva con le stesse caratteristiche in entrambi in gruppi presi in esame. Il simian virus 12 è stato isolato per la prima volta da una coltura di cellule renali derivate dal *Cercopithecus pygerythrus*, una scimmia tipica del Sud Africa [23]. Le analisi filogenetiche hanno rilevato un'elevata omologia di sequenza con BKV, JCV e SV40 ma ad oggi non sono riportate in letteratura associazioni patologiche specifiche. Considerando la stretta associazione riscontrata nelle nostre analisi fra questo genoma virale e la frazione esosomiale sierica e urinaria, sicuramente esso necessita di approfondimento.

Il genoma virale del JCV, assente nella frazione esosomiale CD9 positiva, mostra un pattern coerente con quanto descritto per le NV isolate con il PEG, ovvero che circoli come cell free DNA, poiché completamente digerito dall'azione enzimatica della DNASI I, sia nel siero dei pazienti trapiantati che nei donatori analizzati.

Per gli HPV mucosali testati, invece, non si è delineato un trend apprezzabile, né analizzando le NV isolate con il PEG né quelle derivate dalla separazione immunomagnetica. Tale situazione non subisce modificazioni relate allo status di donatore o ricevente, né se si considerano le NV sieriche piuttosto che quelle urinarie. Infatti, le pochissime positività ottenute sono state quasi sempre associate a casi isolati e non superano mai il 10%. L'HPV18 è apparso essere il genoma virale più abbondante (10%) nelle NV isolate mediante PEG, ma nessuna positività per lo stesso genoma è stata rilevata a seguito della separazione immunomagnetica. Inoltre, sembra esserci una certa resistenza al trattamento enzimatico, ma essendo le positività limitate anche le conseguenti fluttuazioni a seguito del trattamento potrebbero risentirne, portando a speculazioni errate. E' interessante notare come nessuno dei genotipi ad alto rischio oncogeno sia stato rilevato in modo significativo nella coorte dei pazienti trapiantati, essendo essi sottoposti a terapia immunospressiva e pertanto esposti ad un maggior rischio di sviluppare neoplasie. Probabilmente l'arco temporale osservato non è sufficiente a palesare trasformazioni oncogene su numeri così ampi.

6. Conclusioni

L'indagine svolta in questo progetto, mirata a identificare genomi virali associati o contenuti all'interno di NV e standardizzare un metodo per la determinazione dei genomi virali stessi, ha portato ad individuare nella combinazione fra l'isolamento mediante separazione immunomagnetica e il trattamento enzimatico con la DNAsi I, il metodo migliore per la determinazione dei genomi virali contenuti all'interno degli esosomi.

L'isolamento delle NV basato sul PEG infatti, seppur rapido si rivela essere aspecifico e viziato da copurificazioni indesiderate. Utile per la determinazione fenotipica delle vescicole isolate è l'analisi effettuata al MACSplex attraverso la quale si possono ottenere informazioni sui marcatori di superficie esosomiali che possono riflettere la cellula d'origine o lo stato in cui versava al momento della gemmazione dalla stessa.

La presenza del genoma virale di SV12 negli esosomi sierici e urinari è stata associata per la prima volta ai pazienti sottoposti a trapianto renale, attraverso questo studio e necessita degli opportuni approfondimenti.

In base ai dati emersi da questo progetto pilota, il sistema di rilevazione basato sulla spettrometria di massa è sembrato essere sensibile e riproducibile.

7. Bibliografia

- [1] Laupacis A, Keown P, Pus N, Krueger H, Ferguson B, Wong C, Muirhead N. A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney Int.* 1996 Jul;50(1):235-42. PubMed PMID: 8807593.
- [2] Coresh J. Update on the Burden of CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Apr;28(4):1020-1022. doi: 10.1681/ASN.2016121374. Epub 2017 Mar 16. PubMed PMID: 28302756; PubMed Central PMCID: PMC5373470.
- [3] Rao PS, Merion RM, Ashby VB, Port FK, Wolfe RA, Kayler LK. Renal transplantation in elderly patients older than 70 years of age: results from the Scientific Registry of Transplant Recipients. *Transplantation.* 2007 Apr 27;83(8):1069-74. PubMed PMID: 17452897.
- [4] Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, Dimitrov BD, Turturro M, Locatelli G, Rigotti P, Baldan N, Beatini M, Valente U, Scalamogna M, Ruggenti P; Dual Kidney Transplant Group. Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med.* 2006 Jan 26;354(4):343-52. PubMed PMID: 16436766.
- [5] Nickeleit V. Foretelling the future: predicting graft outcome by evaluating kidney baseline transplant biopsies. *J Am Soc Nephrol.* 2013 Nov;24(11):1716-9. doi: 10.1681/ASN.2013070761. Epub 2013 Aug 29. PubMed PMID: 23990674; PubMed Central PMCID: PMC3810094.
- [6] Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 1999 Dec 2;341(23):1725-30. PubMed PMID: 10580071.
- [7] Santoro-Lopes G, de Gouvêa EF. Multidrug-resistant bacterial infections after liver transplantation: an ever-growing challenge. *World J Gastroenterol.* 2014 May 28;20(20):6201-10. doi: 10.3748/wjg.v20.i20.6201. Review. PubMed PMID: 24876740; PubMed Central PMCID: PMC4033457.
- [8] Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2013 Mar;13 Suppl 4:3-8. doi: 10.1111/ajt.12093. PubMed PMID: 23464993.
- [9] Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med.* 2007 Dec 20;357(25):2601-14. Review. PubMed PMID: 18094380.
- [10] Fischer SA, Lu K; AST Infectious Diseases Community of Practice. Screening of donor and recipient in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2013 Mar;13 Suppl 4:9-21. doi: 10.1111/ajt.12094. PubMed PMID: 23464994.
- [11] Patel G, Huprikar S. Infectious complications after orthotopic liver transplantation. *Semin Respir Crit Care Med.* 2012 Feb;33(1):111-24. doi: 10.1055/s-0032-1301739. Epub 2012 Mar 23. Review. PubMed PMID: 22447265.
- [12] Lübbert C, Becker-Rux D, Rodloff AC, Laudi S, Busch T, Bartels M, Kaisers UX. Colonization of liver transplant recipients with KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with high infection rates and excess mortality: a case-control analysis. *Infection.* 2014 Apr;42(2):309-16. doi: 10.1007/s15010-013-0547-3. Epub 2013 Nov 12. PubMed PMID: 24217959.
- [13] Lübbert C, Hau HM, Rodloff A, Mössner J, Mischnik A, Bercker S, Bartels M, Kaisers UX. [Clinical impact of infections with carbapenem-resistant enterobacteriaceae in liver transplant recipients]. *Z Gastroenterol.* 2015 Nov;53(11):1276-87. doi: 10.1055/s-0041-106855. Epub 2015 Nov 12. Review. German. PubMed PMID: 26562402.

- [14] White MK, Gordon J, Khalili K. The rapidly expanding family of human polyomaviruses: recent developments in understanding their life cycle and role in human pathology. *PLoS Pathog.* 2013 Mar;9(3):e1003206. doi: 10.1371/journal.ppat.1003206. Epub 2013 Mar 14. Review. PubMed PMID: 23516356; PubMed Central PMCID: PMC3597531.
- [15] Padgett BL, Walker DL, Zurhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.* 1971 Jun 19;1(7712):1257-60. PubMed PMID: 4104715.
- [16] Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1971 Jun 19;1(7712):1253-7. PubMed PMID: 4104714.
- [17] Atkin SJ, Griffin BE, Dilworth SM. Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: history and perspectives. *Semin Cancer Biol.* 2009 Aug;19(4):211-7. doi:10.1016/j.semcancer.2009.03.001. Epub 2009 Mar 14. Review. PubMed PMID: 19505648.
- [18] Cheng J, DeCaprio JA, Fluck MM, Schaffhausen BS. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Semin Cancer Biol.* 2009 Aug;19(4):218-28. doi: 10.1016/j.semcancer.2009.03.002. Epub 2009 Mar 31. Review. PubMed PMID: 19505649; PubMed Central PMCID: PMC2694755.
- [19] Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, Steiger J, Mihatsch MJ, Hopfer H, Mayr M. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant.* 2010 Dec;10(12):2615-23. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03310.x. PubMed PMID:21114642.
- [20] Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, Major EO, Ramqvist T, Norkin LC. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol.* 2011 Sep;156(9):1627-34. doi: 10.1007/s00705-011-1008-x. Epub 2011 May 12. PubMed PMID: 21562881; PubMed Central PMCID: PMC3815707.
- [21] Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A. Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol.* 2007 Aug;81(16):8552-62. Epub 2007 Jun 6. PubMed PMID: 17553887; PubMed Central PMCID: PMC1951349.
- [22] Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis.* 2003 Oct;3(10):611-23. Review. PubMed PMID: 14522260.
- [23] Cantalupo P, Doering A, Sullivan CS, Pal A, Peden KW, Lewis AM, Pipas JM. Complete nucleotide sequence of polyomavirus SA12. *J Virol.* 2005 Oct;79(20):13094-104. PubMed PMID: 16189011; PubMed Central PMCID: PMC1235855
- [24] Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses.* 2015 Jul 16;7(7):3863-90. doi: 10.3390/v7072802. Review. PubMed PMID: 26193301; PubMed Central PMCID: PMC4517131.
- [25] Van Doorslaer K, Li Z, Xirasagar S, Maes P, Kaminsky D, Liou D, Sun Q, Kaur R, Huyen Y, McBride AA. The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic Acids Res* 2017; 4;45(D1):D499-D506.
- [26] Cardoso JC, Calonje E. Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: a review. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011 Sep;20(3):145-54. Review. PubMed PMID: 22131115.
- [27] Stoler MH. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol.* 2000 Jan;19(1):16-28. Review. PubMed PMID: 10638450.

- [28] Van Doorslaer K. Evolution of the papillomaviridae. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):11-20. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.012. Epub 2013 Jun 14. Review. PubMed PMID: 23769415.
- [29] de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):17-27. Review. PubMed PMID:15183049.
- [30] Touze A, Coursaget P. In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucleic Acids Res*. 1998 Mar 1;26(5):1317-23. PubMed PMID: 9469843; PubMed Central PMCID: PMC147398.
- [31] Müller M, Gissmann L, Cristiano RJ, Sun XY, Frazer IH, Jenson AB, Alonso A, Zentgraf H, Zhou J. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol*. 1995 Feb;69(2):948-54. PubMed PMID: 7815562; PubMed Central PMCID: PMC188663.
- [32] Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 1997 Mar;71(3):2449-56. PubMed PMID: 9032382; PubMed Central PMCID: PMC191355.
- [33] Brendle SA, Christensen ND. HPV binding assay to Laminin-332/integrin $\alpha 6 \beta 4$ on human keratinocytes. *Methods Mol Biol*. 2015;1249:53-66. doi:10.1007/978-1-4939-2013-6_4. PubMed PMID: 25348297.
- [34] Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol*. 2003 Dec;77(24):13125-35. PubMed PMID: 14645569; PubMed Central PMCID: PMC296080.
- [35] Culp TD, Christensen ND. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology*. 2004 Feb 5;319(1):152-61. PubMed PMID: 14967496.
- [36] Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. 2003 Mar 1;307(1):1-11. PubMed PMID: 12667809
- [37] EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 May;12(5):347-57. doi: 10.1038/nrd3978. Epub 2013 Apr 15. Review. PubMed PMID: 23584393.
- [38] Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Oliván M, Oliveira C, Pállinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostenfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015 May 14;4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066. eCollection 2015. PubMed PMID: 25979354; PubMed Central PMCID: PMC4433489.
- [39] Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Théry C, Raposo G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles.

J Cell Sci. 2013 Dec 15;126(Pt 24):5553-65. doi: 10.1242/jcs.128868. Epub 2013 Oct 8. PubMed PMID: 24105262.

[40] André F, Schartz NE, Chaput N, Flament C, Raposo G, Amigorena S, Angevin E, Zitvogel L. Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine*. 2002 Dec 19;20 Suppl 4:A28-31. Review. PubMed PMID: 12477425.

[41] Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 2014 Aug;29:116-25. doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004. Epub 2014 Jun 22. Review. PubMed PMID: 24959705.

[42] Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*. 2016 Mar 10;164(6):1226-1232. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.043. Review. PubMed PMID: 26967288.

[43] Harding C, Stahl P. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Jun 15;113(2):650-8. PubMed PMID: 6870878.

[44] Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983 Jul;33(3):967-78. PubMed PMID: 6307529.

[45] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3):1161-72. PubMed PMID: 8642258; PubMed Central PMCID: PMC2192324.

[46] Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654-9. Epub 2007 May 7. PubMed PMID: 17486113.

[47] Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012 Jun;18(6):883-91. doi: 10.1038/nm.2753. Erratum in: *at Med*. 2016 Dec 6;22(12):1502. PubMed PMID: 22635005; PubMed Central PMCID: PMC3645291.

[48] Yu S, Cao H, Shen B, Feng J. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure. *Oncotarget*. 2015 Nov 10;6(35):37151-68. doi: 10.18632/oncotarget.6022. Review. PubMed PMID: 26452221; PubMed Central PMCID: PMC4741921.

[49] Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev*. 2013 Dec;32(3-4):623-42. doi: 10.1007/s10555-013-9441-9. Review. PubMed PMID: 23709120; PubMed Central PMCID: PMC3843988.

[50] Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol*. 2015 Jul 10;8:83. doi: 10.1186/s13045-015-0181-x. Review. PubMed PMID: 26156517; PubMed Central PMCID: PMC4496882.

[51] Principe S, Hui AB, Bruce J, Sinha A, Liu FF, Kislinger T. Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: implications for tumor biology and biomarker discovery. *Proteomics*. 2013 May;13(10-11):1608-23. doi: 10.1002/pmic.201200533. Review. PubMed PMID: 23505015.

- [52] Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):790-800. doi: 10.1056/NEJMra0801289. Review. PubMed PMID: 19228622.
- [53] Friel AM, Corcoran C, Crown J, O'Driscoll L. Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Oct;123(3):613-25. doi: 10.1007/s10549-010-0980-2. Epub 2010 Jun 15. Review. PubMed PMID: 20549336.
- [54] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008 Jul;110(1):13-21. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.04.033. Erratum in: *Gynecol Oncol*. 2010 Jan;116(1):153. PubMed PMID: 18589210.
- [55] Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, Watanabe M, Baba H. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2013 Mar 15;119(6):1159-67. doi: 10.1002/cncr.27895. Epub 2012 Dec 7. PubMed PMID: 23224754.
- [56] Fujita Y, Yoshioka Y, Ito S, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Intercellular communication by extracellular vesicles and their microRNAs in asthma. *Clin Ther*. 2014 Jun 1;36(6):873-81. doi: 10.1016/j.clinthera.2014.05.006. Epub 2014 Jun 6. PubMed PMID: 24909737.
- [57] Lötvalld J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014 Dec 22;3:26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913. eCollection 2014. PubMed PMID: 25536934; PubMed Central PMCID: PMC4275645.
- [58] Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *Int J Mol Med*. 2015 Jul;36(1):11-7. doi: 10.3892/ijmm.2015.2194. Epub 2015 Apr 22. Review. PubMed PMID: 25902369; PubMed Central PMCID: PMC4494580.
- [59] Clayton A, Court J, Navabi H, Adams M, Mason MD, Hobot JA, Newman GR, Jasani B. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immunomagnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2001 Jan 1;247(1-2):163-74. PubMed PMID: 11150547.
- [60] Sabapatha A, Gercel-Taylor C, Taylor DD. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol*. 2006 Nov-Dec;56(5-6):345-55. PubMed PMID: 17076679.
- [61] Merchant ML, Powell DW, Wilkey DW, Cummins TD, Deegens JK, Rood IM, McAfee KJ, Fleischer C, Klein E, Klein JB. Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS. *Proteomics Clin Appl*. 2010 Jan;4(1):84-96. doi: 10.1002/prca.200800093. Epub 2009 Nov 11. PubMed PMID: 21137018.
- [62] Oosthuyzen W, Sime NE, Ivy JR, Turtle EJ, Street JM, Pound J, Bath LE, Webb DJ, Gregory CD, Bailey MA, Dear JW. Quantification of human urinary exosomes by nanoparticle tracking analysis. *J Physiol*. 2013 Dec 1;591(23):5833-42. doi: 10.1113/jphysiol.2013.264069. Epub 2013 Sep 23. PubMed PMID: 24060994; PubMed Central PMCID: PMC3872755.
- [63] Taylor DD, Zacharias W, Gercel-Taylor C. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling. *Methods Mol Biol*. 2011;728:235-46. doi: 10.1007/978-1-61779-068-3_15. PubMed PMID: 21468952.

- [64] Yoo CE, Kim G, Kim M, Park D, Kang HJ, Lee M, Huh N. A direct extraction method for microRNAs from exosomes captured by immunoaffinity beads. *Anal Biochem.* 2012 Dec 15;431(2):96-8. doi: 10.1016/j.ab.2012.09.008. Epub 2012 Sep 11. PubMed PMID: 22982508.
- [65] Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006 Apr;Chapter 3:Unit 3.22. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30. PubMed PMID: 18228490.
- [66] Van der Pol E, Böing AN, Gool EL, Nieuwland R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost.* 2016 Jan;14(1):48-56. doi: 10.1111/jth.13190. Epub 2015 Dec 29. Review. Erratum in: *J Thromb Haemost.* 2016 Oct;14 (10):2087. PubMed PMID: 26564379.
- [67] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987 Jul 5;262(19):9412-20. PubMed PMID:3597417.
- [68] van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 2012 Jul;64(3):676-705. doi: 10.1124/pr.112.005983. Epub 2012 Jun 21. Review. PubMed PMID: 22722893.
- [69] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138. Review. PubMed PMID: 23420871; PubMed Central PMCID: PMC3575529.
- [70] Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002 Aug;2(8):569-79. doi: 10.1038/nri855. Review. PubMed PMID: 12154376.
- [71] Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2013 Feb 15;2. doi: 10.3402/jev.v2i0.20389. eCollection 2013. PubMed PMID: 24009890; PubMed Central PMCID: PMC3760635.
- [72] Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J.* 2011 Aug 31;30(17):3481-500. doi: 10.1038/emboj.2011.286. Review. PubMed PMID: 21878991; PubMed Central PMCID: PMC3181477.
- [73] Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V, Schwartz AL. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell.* 1991 May 3;65(3):417-27. PubMed PMID: 1850321.
- [74] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacoen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* 2010 Jan;12(1):19-30; sup pp 1-13. doi: 10.1038/ncb2000. Epub 2009 Dec 6. PubMed PMID:19966785.
- [75] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jul;1820(7):940-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017. Epub 2012 Apr 1. Review. PubMed PMID: 22503788.
- [76] Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal

research. *J Extracell Vesicles*. 2012 Apr 16;1. doi: 10.3402/jev.v1i0.18374. eCollection 2012. PubMed PMID: 24009883; PubMed Central PMCID: PMC3760644.

[77] Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, Go G, Nhung D, Hong K, Jang SC, Kim SH, Park KS, Kim OY, Park HT, Seo JH, Aikawa E, Baj-Krzyworzeka M, van Balkom BW, Belting M, Blanc L, Bond V, Bongiovanni A, Borràs FE, Buée L, Buzás EI, Cheng L, Clayton A, Cocucci E, Dela Cruz CS, Desiderio DM, Di Vizio D, Ekström K, Falcon-Perez JM, Gardiner C, Giebel B, Greening DW, Gross JC, Gupta D, Hendrix A, Hill AF, Hill MM, Nolte-'t Hoen E, Hwang DW, Inal J, Jagannadham MV, Jayachandran M, Jee YK, Jørgensen M, Kim KP, Kim YK, Kislinger T, Lässer C, Lee DS, Lee H, van Leeuwen J, Lener T, Liu ML, Lötvall J, Marcilla A, Mathivanan S, Möller A, Morhayim J, Mullier F, Nazarenko I, Nieuwland R, Nunes DN, Pang K, Park J, Patel T, Pocsfalvi G, Del Portillo H, Putz U, Ramirez MI, Rodrigues ML, Roh TY, Royo F, Sahoo S, Schiffelers R, Sharma S, Siljander P, Simpson RJ, Soekmadji C, Stahl P, Stensballe A, Stępień E, Tahara H, Trummer A, Valadi H, Vella LJ, Wai SN, Witwer K, Yáñez-Mó M, Youn H, Zeidler R, Gho YS. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*. 2015 Mar 15;31(6):933-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu741. Epub 2014 Nov 10. PubMed PMID: 25388151; PubMed Central PMCID: PMC4375401.

[78] Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*. 2015 Aug 1;65(8):783-797. Epub 2015 Jun 26. PubMed PMID: 26955082; PubMed Central PMCID: PMC4776721.

[79] Duijvesz D, Burnum-Johnson KE, Gritsenko MA, Hoogland AM, Vredenburg-van den Berg MS, Willemsen R, Luider T, Paša-Tolić L, Jenster G. Proteomic profiling of exosomes leads to the identification of novel biomarkers for prostate cancer. *PLoS One*. 2013 Dec 31;8(12):e82589. doi: 10.1371/journal.pone.0082589. eCollection 2013. PubMed PMID: 24391718; PubMed Central PMCID: PMC3876995.

[80] Horgan CP, Hanscom SR, Kelly EE, McCaffrey MW. Tumor susceptibility gene 101 (TSG101) is a novel binding-partner for the class II Rab11-FIPs. *PLoS One*. 2012;7(2):e32030. doi: 10.1371/journal.pone.0032030. Epub 2012 Feb 14. PubMed PMID: 22348143; PubMed Central PMCID: PMC3279423.

[81] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009 Aug;9(8):581-93. doi: 10.1038/nri2567. Epub 2009 Jun 5. Review. PubMed PMID: 19498381.

[82] Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*. 2008 Oct;8(19):4083-99. doi: 10.1002/pmic.200800109. Review. PubMed PMID: 18780348.

[83] Hosseini-Beheshti E, Pham S, Adomat H, Li N, Tomlinson Guns ES. Exosomes as biomarker enriched microvesicles: characterization of exosomal proteins derived from a panel of prostate cell lines with distinct AR phenotypes. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Oct;11(10):863-85. Epub 2012 Jun 21. PubMed PMID: 22723089; PubMed Central PMCID: PMC3494141.

[84] Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, BuchananM, Hosein AN, Basik M, Wrana JL. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*. 2012 Dec 21;151(7):1542-56. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.024. PubMed PMID: 23260141.

[85] Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012 Oct;14(10):1036-45. doi: 10.1038/ncb2574. Epub 2012 Sep 16. PubMed PMID: 22983114.

[86] Recchi C, Seabra MC. Novel functions for Rab GTPases in multiple aspects of tumour progression. *Biochem Soc Trans*. 2012 Dec 1;40(6):1398-403. doi:

10.1042/BST20120199. Review. PubMed PMID: 23176488; PubMed Central PMCID:PMC3554041.

[87] Kesimer M, Scull M, Brighton B, DeMaria G, Burns K, O'Neal W, Pickles RJ, Sheehan JK. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J.* 2009 Jun;23(6):1858-68. doi: 10.1096/fj.08-119131. Epub 2009 Feb 3. PubMed PMID: 19190083; PubMed Central PMCID: PMC2698655.

[88] Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura S, Yamaguchi K, Mochizuki T. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One.* 2010 Oct 8;5(10):e13247. doi: 10.1371/journal.pone.0013247. PubMed PMID: 20949044; PubMed Central PMCID: PMC2951912.

[89] Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, Lochnit G, Preissner KT, Zöller M. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res.* 2010 Feb 15;70(4):1668-78. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2470. Epub 2010 Feb 2. Erratum in: *Cancer Res.* 2010 Aug 15;70(16):6683. PubMed PMID: 20124479.

[90] Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 2011;2:282. doi: 10.1038/ncomms1285. PubMed PMID: 21505438; PubMed Central PMCID:PMC3104548.

[91] Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, Martínez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun.* 2013;4:2980. doi:10.1038/ncomms3980. PubMed PMID: 24356509; PubMed Central PMCID: PMC3905700.

[92] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008 Feb 29;319(5867):1244-7. doi: 10.1126/science.1153124. PubMed PMID: 18309083.

[93] Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie.* 2007 Feb;89(2):205-12. Epub 2006 Nov 16. Review. PubMed PMID: 17157973.

[94] R. Wubbolts, R. S. Leckie, P. T. M. Veenhuizen, G. Schwarzmann, W. Mobius, J. Hoernschemeyer, J. W. Slot, H. J. Geuze, W. Stoorvogel, *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 10963

[95] Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux JF, Kobayashi T, Salles JP, Perret B, Bonnerot C, Record M. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J.* 2004 May 15;380(Pt 1):161-71. PubMed PMID: 14965343; PubMed Central PMCID: PMC1224152.

[96] Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008 Dec;10(12):1470-6. doi:

- 10.1038/ncb1800. Epub 2008 Nov 16. PubMed PMID: 19011622; PubMed Central PMCID: PMC3423894.
- [97] Lobb RJ, Lima LG, Möller A. Exosomes: Key mediators of metastasis and pre-metastatic niche formation. *Semin Cell Dev Biol.* 2017 Jul;67:3-10. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.01.004. Epub 2017 Jan 8. Review. PubMed PMID: 28077297.
- [98] Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 25;103(30):11172-7. Epub 2006 Jul 12. PubMed PMID: 16837572; PubMed Central PMCID: PMC1544060.
- [99] Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Würdinger T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 6;107(14):6328-33. doi: 10.1073/pnas.0914843107. Epub 2010 Mar 18. PubMed PMID: 20304794; PubMed Central PMCID: PMC2851954.
- [100] Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, Longo S, Correa P, Illanes SE, Rice GE. Placental Exosomes as Early Biomarker of Preeclampsia: Potential Role of Exosomal MicroRNAs Across Gestation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017 Sep 1;102(9):3182-3194. doi: 10.1210/jc.2017-00672. PubMed PMID: 28531348.
- [101] Elfeky O, Longo S, Lai A, Rice GE, Salomon C. Influence of maternal BMI on the exosomal profile during gestation and their role on maternal systemic inflammation. *Placenta.* 2017 Feb;50:60-69. doi: 10.1016/j.placenta.2016.12.020. Epub 2016 Dec 21. PubMed PMID: 28161063.
- [102] Salomon C, Scholz-Romero K, Sarker S, Sweeney E, Kobayashi M, Correa P, Longo S, Duncombe G, Mitchell MD, Rice GE, Illanes SE. Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation. *Diabetes.* 2016 Mar;65(3):598-609. doi: 10.2337/db15-0966. Epub 2015 Dec 30. PubMed PMID: 26718504.
- [103] Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2014 Jun;10(6):356-64. doi: 10.1038/nrrheum.2014.19. Epub 2014 Feb 18. Review. PubMed PMID: 24535546.
- [104] Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol.* 2008 May;18(5):199-209. doi: 10.1016/j.tcb.2008.03.002. Epub 2008 Apr 7. Review. PubMed PMID: 18396047; PubMed Central PMCID: PMC3754907.
- [105] Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2008 May;10(5):619-24. doi: 10.1038/ncb1725. Epub 2008 Apr 20. Erratum in: *Nat Cell Biol.* 2008 Jun;10(6):752. PubMed PMID: 18425114.
- [106] Zhang Y, Wang XF. A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nat Cell Biol.* 2015 Jun;17(6):709-11. doi: 10.1038/ncb3181. PubMed PMID: 26022917.
- [107] Syn N, Wang L, Sethi G, Thiery JP, Goh BC. Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial-Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Jul;37(7):606-617. doi: 10.1016/j.tips.2016.04.006. Epub 2016 May 3. Review. PubMed PMID: 27157716.
- [108] Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, Becker A, Hoshino A, Mark MT, Molina H, Xiang J, Zhang T, Theilen TM, García-Santos G, Williams C, Ararso Y, Huang Y, Rodrigues G, Shen TL, Labori KJ, Lothe IM, Kure

EH, Hernandez J, Doussot A, Ebbesen SH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Schwartz RE, Matei I, Peinado H, Stanger BZ, Bromberg J, Lyden D. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol.* 2015 Jun;17(6):816-26. doi: 10.1038/ncb3169. Epub 2015 May 18. PubMed PMID: 25985394; PubMed Central PMCID: PMC5769922.

[109] Wen SW, Sceneay J, Lima LG, Wong CS, Becker M, Krumeich S, Lobb RJ, Castillo V, Wong KN, Ellis S, Parker BS, Möller A. The Biodistribution and Immune Suppressive Effects of Breast Cancer-Derived Exosomes. *Cancer Res.* 2016 Dec;76(23):6816-6827. Epub 2016 Oct 19. PubMed PMID: 27760789.

[110] Lobb RJ, van Amerongen R, Wiegmans A, Ham S, Larsen JE, Möller A. Exosomes derived from mesenchymal non-small cell lung cancer cells promote chemoresistance. *Int J Cancer.* 2017 Aug 1;141(3):614-620. doi:10.1002/ijc.30752. Epub 2017 May 12. PubMed PMID: 28445609.

[111] Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringnér M, Mörgelin M, Bourseau-Guilmain E, Bengzon J, Belting M. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Apr 30;110(18):7312-7. doi: 10.1073/pnas.1220998110. Epub 2013 Apr 15. PubMed PMID:23589885; PubMed Central PMCID: PMC3645587.

[112] Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, Salto-Tellez M, Timmers L, Lee CN, El Oakley RM, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Lim SK. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2010 May;4(3):214-22. doi: 10.1016/j.scr.2009.12.003. Epub 2010 Jan 4. PubMed PMID: 20138817.

[113] Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, Psaila B, Kaplan RN, Bromberg JF, Kang Y, Bissell MJ, Cox TR, Giaccia AJ, Erler JT, Hiratsuka S, Ghajar CM, Lyden D. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer.* 2017 May;17(5):302-317. doi: 10.1038/nrc.2017.6. Epub 2017 Mar 17. Review. PubMed PMID: 28303905.

[114] Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest.* 2016 Apr 1;126(4):1208-15. doi: 10.1172/JCI81135. Epub 2016 Apr 1. Review. PubMed PMID: 27035812; PubMed Central PMCID: PMC4811149.

[115] Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer.* 2009 Apr;9(4):285-93. doi: 10.1038/nrc2621. Review. PubMed PMID: 19308068; PubMed Central PMCID: PMC3682494.

[116] Sceneay J, Smyth MJ, Möller A. The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev.* 2013 Dec;32(3-4):449-64. doi:10.1007/s10555-013-9420-1. Review. PubMed PMID: 23636348.

[117] Wiley RD, Gummuluru S. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 17;103(3):738-43. Epub 2006 Jan 9. PubMed PMID: 16407131; PubMed Central PMCID: PMC1344656.

[118] Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE, Salomon C. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med.* 2014 Aug 8;12:204. doi:10.1186/1479-5876-12-204. PubMed PMID: 25104112; PubMed Central PMCID:PMC4283151

[119] Mitchell MD, Peiris HN, Kobayashi M, Koh YQ, Duncombe G, Illanes SE, Rice GE, Salomon C. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 Oct;213(4 Suppl):S173-81. doi: 10.1016/j.ajog.2015.07.001. Review. PubMed PMID: 26428497.

- [120] Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, Scholz-Romero K, Sobrevia L, Dobierzewska A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS One*. 2014 Jun 6;9(6):e98667. doi: 10.1371/journal.pone.0098667. eCollection 2014. PubMed PMID: 24905832; PubMed Central PMCID: PMC4048215.
- [121] Adam S, Elfeky O, Kinhal V, Dutta S, Lai A, Jayabalan N, Nuzhat Z, Palma C, Rice GE, Salomon C. Review: Fetal-maternal communication via extracellular vesicles - Implications for complications of pregnancies. *Placenta*. 2017 Jun;54:83-88. doi: 10.1016/j.placenta.2016.12.001. Epub 2016 Dec 5. Review. PubMed PMID: 27939894.
- [122] Salomon C, Kobayashi M, Ashman K, Sobrevia L, Mitchell MD, Rice GE. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes. *PLoS One*. 2013 Nov 11;8(11):e79636. doi: 10.1371/journal.pone.0079636. eCollection 2013. PubMed PMID: 24244532; PubMed Central PMCID: PMC3823597.
- [123] Rice GE, Scholz-Romero K, Sweeney E, Peiris H, Kobayashi M, Duncombe G, Mitchell MD, Salomon C. The Effect of Glucose on the Release and Bioactivity of Exosomes From First Trimester Trophoblast Cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Oct;100(10):E1280-8. doi: 10.1210/jc.2015-2270. Epub 2015 Aug 4. PubMed PMID: 26241326.
- [124] Truong G, Guanzon D, Kinhal V, Elfeky O, Lai A, Longo S, Nuzhat Z, Palma C, Scholz-Romero K, Menon R, Mol BW, Rice GE, Salomon C. Oxygen tension regulates the miRNA profile and bioactivity of exosomes released from extravillous trophoblast cells - Liquid biopsies for monitoring complications of pregnancy. *PLoS One*. 2017 Mar 28;12(3):e0174514. doi: 10.1371/journal.pone.0174514. eCollection 2017. PubMed PMID: 28350871; PubMed Central PMCID: PMC5370130.
- [125] Soung YH, Ford S, Zhang V, Chung J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers (Basel)*. 2017 Jan 12;9(1). pii: E8. doi: 10.3390/cancers9010008. Review. PubMed PMID: 28085080; PubMed Central PMCID: PMC5295779.
- [126] Rupp AK, Rupp C, Keller S, Brase JC, Ehehalt R, Fogel M, Moldenhauer G, Marmé F, Sültmann H, Altevogt P. Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage. *Gynecol Oncol*. 2011 Aug;122(2):437-46. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.04.035. Epub 2011 May 20. PubMed PMID: 21601258.
- [127] Khan S, Bennit HF, Turay D, Perez M, Mirshahidi S, Yuan Y, Wall NR. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer*. 2014 Mar 12;14:176. doi: 10.1186/1471-2407-14-176. PubMed PMID: 24620748; PubMed Central PMCID: PMC3995700.
- [128] Szajnik M, Derbis M, Lach M, Patalas P, Michalak M, Drzewiecka H, Szpurek D, Nowakowski A, Spaczynski M, Baranowski W, Whiteside TL. Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy. *Gynecol Obstet (Sunnyvale)*. 2013 Apr 29;Suppl 4:3. PubMed PMID: 24466501; PubMed Central PMCID: PMC3899646.
- [129] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, LeBleu VS, Mittendorf EA, Weitz J, Rahbari N, Reissfelder C, Pilarsky C, Fraga MF, Piwnicka-Worms D, Kalluri R. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015 Jul 9;523(7559):177-82. doi: 10.1038/nature14581. Epub 2015 Jun 24. PubMed PMID: 26106858; PubMed Central PMCID: PMC4825698.
- [130] Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2009 Jan;10(1):42-6. doi: 10.3816/CLC.2009.n.006. PubMed PMID: 19289371.

[131] Welker MW, Reichert D, Susser S, Sarrazin C, Martinez Y, Herrmann E, Zeuzem S, Piiper A, Kronenberger B. Soluble serum CD81 is elevated in patients with chronic hepatitis C and correlates with alanine aminotransferase serum activity. *PLoS One*. 2012;7(2):e30796. doi: 10.1371/journal.pone.0030796. Epub 2012 Feb 15. PubMed PMID: 22355327; PubMed Central PMCID: PMC3280260.

[132] Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. *Clin Chem*. 2015 Jan;61(1):56-63. doi: 10.1373/clinchem.2014.221341. Epub 2014 Nov 12. Review. PubMed PMID: 25391989

[133] Dong W, Pan XF, Yu C, Lv J, Guo Y, Bian Z, Yang L, Chen Y, Wu T, Chen Z, Pan A, Li L; China Kadoorie Biobank Collaborative Group. Self-Rated Health Status and Risk of Ischemic Heart Disease in the China Kadoorie Biobank Study: A Population-Based Cohort Study. *J Am Heart Assoc*. 2017 Sep 22;6(9). pii: e006595. doi: 10.1161/JAHA.117.006595. PubMed PMID: 28939702; PubMed Central PMCID: PMC5634301.

[134] Boriachek K, Islam MN, Möller A, Salomon C, Nguyen NT, Hossain MSA, Yamauchi Y, Shiddiky MJA. Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. *Small*. 2018 Feb;14(6). doi: 10.1002/sml.201702153. Epub 2017 Dec 28. Review. PubMed PMID: 29282861.

[135] Lupei MI, Mann HJ, Beilman GJ, Oancea C, Chipman JG. Inadequate antibiotic therapy in solid organ transplant recipients is associated with a higher mortality rate. *Surg Infect (Larchmt)*. 2010 Feb;11(1):33-9. doi: 10.1089/sur.2008.076. PubMed PMID: 19785562.

[136] San Juan R, Aguado JM, Lumbreras C, Díaz-Pedroche C, López-Medrano F, Lizasoain M, Gavalda J, Montejo M, Moreno A, Gurguí M, Torre-Cisneros J; RESITRA Network, Spain. Incidence, clinical characteristics and risk factors of late infection in solid organ transplant recipients: data from the RESITRA study group. *Am J Transplant*. 2007 Apr;7(4):964-71. PubMed PMID: 17391136.

[137] Yang Y, Han Q, Hou Z, Zhang C, Tian Z, Zhang J. Exosomes mediate hepatitis B virus (HBV) transmission and NK-cell dysfunction. *Cell Mol Immunol*. 2017 May;14(5):465-475. doi: 10.1038/cmi.2016.24. Epub 2016 May 30. PubMed PMID: 27238466; PubMed Central PMCID: PMC5423088.

[138] Bukong TN, Momen-Heravi F, Kodys K, Bala S, Szabo G. Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog*. 2014 Oct 2;10(10):e1004424. doi: 10.1371/journal.ppat.1004424. eCollection 2014 Oct. PubMed PMID: 25275643; PubMed Central PMCID: PMC4183590.

[139] Guenat D, Hermetet F, Prétet JL, Mouglin C. Exosomes and Other Extracellular Vesicles in HPV Transmission and Carcinogenesis. *Viruses*. 2017 Aug 7;9(8). pii: E211. doi: 10.3390/v9080211. Review. PubMed PMID: 28783104; PubMed Central PMCID: PMC5580468.

[140] Cricca M, Marasco E, Alessandrini F, Fazio C, Prossomariti A, Savini C, Venturoli S, Chieco P, De Carolis S, Bonafè M, Re MC, Garagnani P, Mantovani V. High-throughput genotyping of high-risk Human Papillomavirus by MALDI-TOF Mass Spectrometry-based method. *New Microbiol*. 2015 Apr;38(2):211-23. Epub 2015 Apr 29. PubMed PMID: 25938746.

[141] Raghino A, Bruno S, Bussolati B, Moggio A, Dimuccio V, Tapparo M, Biancone L, Gontero P, Frea B, Camussi G. The effects of glomerular and tubular renal progenitors and derived extracellular vesicles on recovery from acute kidney injury. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Feb 7;8(1):24. doi: 10.1186/s13287-017-0478-5. PubMed PMID: 28173878; PubMed Central PMCID: PMC5297206.

[142] Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol.* 2012 Mar;27(3):363-73. doi: 10.1007/s00467-011-1939-1. Epub 2011 Jun 29. Review. Erratum in: *Pediatr Nephrol.* 2012 Mar;27(3):507. PubMed PMID: 21713524; PubMed Central PMCID: PMC3264851.