

## EXOSOMII URINARI: UN NOU MIJLOC DE EVALUARE NONINVAZIVĂ A NEFROPATIILOR GLOMERULARE?

SILVIA SPÂNU<sup>1,2</sup>, MIRELA GHERMAN-CĂPRIOARĂ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Clinica de Nefrologie Cluj

<sup>2</sup>Division of Nephrology and Immunology, RWTH Aachen University, Aachen, Germany

### Rezumat

*Exosomii sunt microvezicule de origine endocitară, care sunt eliberate în spațiul extracelular și în variate fluide biologice prin fuziunea corpurilor multiveziculare cu membrana celulară apicală. Exosomii sunt eliberați de către variate tipuri celulare din organism, iar cei identificați în urină provin din toate tipurile de celule epiteliale renale.*

*Studiile de proteomică au evidențiat că exosomii conțin un set comun de proteine membranare și citosolice și un subset de proteine caracteristice celulei de origine, precum podocina și podocalixina pentru podocit.*

*Cercetările recente în domeniul proteomicii se concentrează asupra descoperirii de biomarkeri noninvasivi pentru diagnosticul precoce și monitorizarea evoluției și a răspunsului la tratament a variatelor nefropatii. În acest sens, exosomii urinari reprezintă o sursă potențială importantă de biomarkeri, deoarece prin spectrometrie de masă s-a evidențiat concentrarea în aceste microvezicule a unor proteine rare, cu posibilă semnificație diagnostică specifică pentru nefropatiile care afectează practic orice segment al nefronului.*

*Analiza exosomilor urinari este un domeniu recent de cercetare, care are de înfruntat numeroase provocări până la aplicarea ei în laboratorul clinic, însă rezultatele actuale sunt de perspectivă în cercetarea nefrologică.*

**Cuvinte cheie:** exosomi urinari, biomarkeri, nefropatii glomerulare.

## URINARY EXOSOMES: A NOVEL NONINVASIVE APPROACH TO GLOMERULAR DISEASES?

### Abstract

*Exosomes are microvesicles of endocytic origin, which are released into the extracellular environment and various body fluids by fusion of the multivesicular bodies with the apical cell membrane. They are released from various cell types in the organism and the ones identified in urine originate from all renal epithelial cell types.*

*Proteomic analysis revealed that exosomes harbour a common set of membrane and cytosolic proteins, as well as a subset of proteins characteristic for their cell of origin, like podocin and podocalyxin for the podocyte.*

*Recent proteomic research focuses on the discovery of noninvasive biomarkers for early diagnosis and monitoring evolution and treatment response of various nephropathies. In these regards, mass spectrometry analysis showed that urinary exosomes are an important potential source of biomarkers, as they concentrate numerous rare proteins with possible specific diagnostic value for nephropathies involving practically every segment of the nephron.*

*Urinary exosome analysis is a recent research field which still faces many challenges, but it has already shown to be of perspective in nephrology research.*

**Keywords:** urinary exosomes, biomarkers, glomerular diseases.

## Introducere

Termenul de „exosom” a fost utilizat prima oară în 1987 de către Johnstone et al. [1,2] pentru a descrie vezicule eliberate de către reticulocitele de oaie pe parcursul cultivării *in vitro* a acestora în studii asupra maturării lor. S-a sugerat că secreția de exosomi ar reprezenta un mecanism de modulare a funcțiilor membranare, prin eliminarea de proteine inutile în cursul maturării reticulocitelor [3].

În prezent exosomii sunt definiți ca și vezicule membranare cu diametre cuprinse între 40 și 100 nm, eliberate în mod normal de către variate tipuri celulare hematopoietice, tumorale și epiteliale [4].

Exosomii urinari sunt vezicule bioactive, formate în compartimentele celulare endocitare tardive - și anume în interiorul corpilor multiveziculari (CMV). Sunt eliberați de către toate tipurile celulare epiteliale care vin în contact cu spațiul urinar: podocite, celule epiteliale tubulare și celulele epiteliului tranzițional [5].

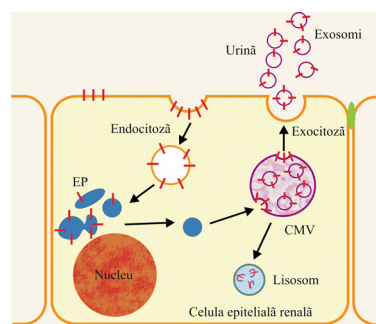
În prezent se depun mari eforturi pentru descoperirea de biomarkeri neinvazivi pentru evaluarea nefropatiilor acute și cronice. Mai mulți biomarkeri candidați se află în curs de evaluare pentru a se stabili eficacitatea acestora în detecția precoce, clasificarea, prognosticarea și monitorizarea răspunsului la tratament a nefropatiilor. Exosomii urinari sunt o sursă bogată de biomarkeri, deoarece sunt eliberați din fiecare segment al nefronului, inclusiv de către podocite. Prin modul lor de formare, exosomii concentrează proteine membranare, precum transportori diverși și canale ionice, dar și proteine citosolice, precum factori de transcripție cu rol central în inițierea și progresia a numeroase nefropatii, a glomerulosclerozei și a fibrozei interstițiale [6].

## Biogeneza și eliberarea exosomilor

Sistemul celular endosomal are un rol important în separarea moleculelor endocitate destinate reciclării de cele care vor fi degradate în lisosomi [7,8]. CMV descriși în 1959 de către Sotelo și Porter [9] sunt organite celulare rotunde sau ovale, localizate cel mai adesea în regiunea apicală a celulelor endoteliale. Ei aparțin lisosomilor secundari, fiind al doilea situs major, alături de proteasom, de procesare a proteinelor membranare [10]. Exosomii derivă din veziculele interne ale CMV. Mecanismul molecular care stă la baza formării exozomilor este în prezent incomplet elucidat. Veziculele interne se formează probabil prin bombarea spre interior a membranei CMV, rezultând astfel un compartiment delimitat de membrană în care lumenul este echivalent din punct de vedere topografic cu citoplasma, spre deosebire de endosomi, care au fața citoplasmatică orientată spre exterior [11].

Proteinele și lipidele membranare sunt recrutate selectiv de pe membrana limitantă a CMV în veziculele în curs de formare. CMV urmează două căi distincte: fie fuzionează cu lisosomii, fapt care conduce la degradarea conținutului lor proteic la acest nivel, fie fuzionează cu membrana plasmatică apicală, rezultând exocitoza

veziculelor interne în spațiul extracelular [12].



**Fig. 1 – Biogeneza și eliberarea exosomilor.** Proteinele endocitate sunt transferate endosomilor precoce (EP), iar apoi corpilor multiveziculari (CMV), de unde sunt fie preluate de către lisosomi și degradate, fie sunt eliberate în spațiul extracelular prin intermediul exosomilor.

Semnalul care marchează proteinele membranei plasmatică pentru încorporarea în CMV este reprezentat de monoubiquitinare - proces prin care pe suprafața proteinei se atașează o singură moleculă de ubiquitină, și care diferă de poliubiquitinare, care marchează proteinele pentru degradarea în proteasom [13]. În procesul de formare al veziculelor interne intervin în continuare trei complexe proteice care aparțin mecanismului de „endosomal sorting complex required for transport” (ESCRT). În final se produce sechestrarea proteinelor cargo în veziculele interne în curs de formare, iar componentele mecanismului ESCRT sunt disociate și reciclate [14,15,16].

Procesul de eliberare al veziculelor interne în spațiul extracelular necesită transportul CMV spre periferia celulei, atașarea și fuziunea acestora cu membrana plasmatică. Se pare că aceste procese depind de proteina Rab 11, care se asociază cu lipidele prezente în CMV și reglează motilitatea acestor compartimente [14]. În diverse tipuri celulare eliberarea veziculelor interne este reglată de stimuli specifici [12], precum: modificări ale concentrației de calciu intracelular în mastocite [17] și într-o linie celulară umană de eritroleucemie [18], iar depolarizarea indusă de potasiu crește secreția de exosomi neuronală [19].

## Rolul biologic al exosomilor

Compoziția moleculară a exosomilor reflectă funcțiile specializate ale celulelor de origine, iar prezența lor în fluide biologice și țesuturi sugerează participarea lor la procese fiziologice și/sau patologice [14].

În ultimii ani cercetarea exosomilor a fost stimulată de observația că celulele prezentatoare de antigen secretă exosomi cu capacitate de stimulare a limfocitelor T *in vitro* [20] și de a induce răspuns imun antitumoral *in vivo* [21].

Exosomii reticulocitari elimină proteine membranare precum receptorul pentru transferină, care devin inutile eritrocitelor mature, deci exosomii ar reprezenta o alternativă în procesarea proteinelor față de degradarea lisosomală [22].

Exosomii pot fi manipulați genetic, astfel încât să exprime o gamă largă de ținte pentru medicamente, incluzând receptori cuplați cu proteina G, precum receptorul pentru somatostatina 2 [23].

S-a evidențiat că exosomii conțin ARN mesager și astfel ar avea rol în comunicarea intercelulară prin transferul de ARNm [24,25].

S-a observat că prezența exosomilor în urină este o caracteristică constantă, cu variație mică interindividuală și în cursul zilei, sugerând posibilitatea rolului exosomilor urinari în detoxifierea organismului [4].

### Compoziția exosomilor urinari

Proteinele urinare includ proteine solubile, majoritatea provenind din filtrarea glomerulară și componentele proteice de fază solidă, care sedimentează la viteze reduse de centrifugare. Exosomii aparțin proteinelor de fază solidă, dar având densitate foarte scăzută sedimentează doar prin ultracentrifugare [26].

Exosomii conțin proteine citosolice, precum și proteomul membranei plasmatică apicale al celulelor epiteliale renale [5].

Analiza proteomică a exosomilor urinari a identificat peste 295 de proteine, dintre care cel puțin 22 sunt cunoscute a fi implicate în diverse nefropatii și boli sistemice [5]. S-au identificat proteine comune tuturor exosomilor, precum tubulina, actina [22], proteinele complexului ESCRT, care joacă rol central în biogeneza exosomilor [27], precum și proteine și ARN specifice celulei de origine: podocina și podocalixina pentru podocite, aquaporina 1 pentru tubul proximal, aquaporina 2 pentru ductul colector [13,22].

Compoziția lipidică a exosomilor este în prezent puțin elucidată, se pare că este similară cu cea a membranei plasmatică a celulei de origine [22,28]. Majoritatea exosomilor studiați conțin cantități mari de lipide, precum colesterolul, sfingolipide și glicerofosfolipide [29,30].

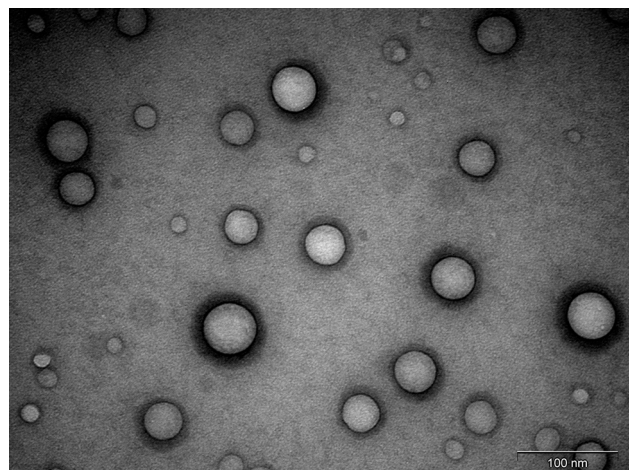
### Izolarea și identificarea exosomilor urinari

Cea mai eficientă metodă de izolare a exosomilor se bazează pe centrifugarea diferențială: inițial urina este centrifugată la viteza standard pentru a îndepărta sedimentul urinar, apoi supernatantul este supus ultracentrifugării pentru a obține sedimentarea membranelor cu densitate joasă [1,31].

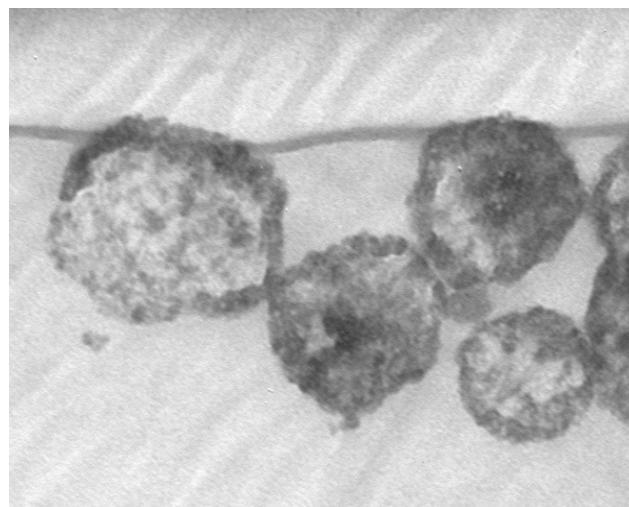
O altă metodă de izolare, propusă pentru studiile clinice, se bazează pe filtrarea supernatantului rezultat în urma centrifugării la viteza standard printr-o nanomembrană de polietersulfonă, care reține majoritatea exosomilor și elimină majoritatea proteinelor solubile [32]. Metode alternative de izolare a exosomilor urinari, care presupun absorbția, evaporarea, dializa și/sau imunoizolarea necesită evaluare suplimentară [1].

Identificarea veziculelor urinare ca și exosomi se bazează pe criterii morfologice și biochimice. Datorită

dimensiunilor reduse, exosomii pot fi vizualizați doar în microscopie electronică [33]. Din punct de vedere morfologic exosomii sunt descriși ca și vezicule rotunde, relativ mici, cu diametre cuprinse între 40 și 100 de nm, acestea fiind de doar 5-10 ori mai mare decât membrana lor limitantă bistratificată, aspect tipic pentru veziculele interne ale CMV. Analiza distribuției dimensiunii veziculelor evidențiază că majoritatea diametrelor se situează între 35 și 40 de nm [13].



**Fig. 2 – Microscopie electronică de transmisie.** Vezicule urinare cu diametre cuprinse între 40 și 100 de nm, izolate prin metoda ultracentrifugării (Laboratorul de microscopie electronică al Universității RWTH Aachen).



**Fig. 3 – Microscopie electronică de transmisie (Mărire 60.000X).** Vezicule urinare cu diametre cuprinse între 50 și 200 de nm izolate prin metoda filtrării (Laboratorul de microscopie electronică al Universității RWTH Aachen).

În vederea caracterizării biochimice a conținutului veziculelor urinare este necesară separarea proteinelor exosomale prin Western blot. Pentru a putea susține că veziculele sunt exosomi este necesară evidențierea proteinelor tipice pentru CMV [13], iar pentru identificarea originii veziculelor este necesară evidențierea proteinelor



celulare specifice: podocina și podocalixina în cazul podocitelor.

### **Rolul exosomilor urinari ca sursă de biomarkeri în nefropatiile medicale**

O țintă majoră în domeniul proteomicii clinice este identificarea biomarkerilor în fluide biologice, care pot fi măsurați cu un cost relativ redus pentru diagnosticul precoce al bolii. O provocare importantă în acest proces este reducerea complexității proteomului fluidului biologic respectiv, pentru a amplifica detectabilitatea proteinelor cu concentrație redusă, care ar putea avea semnificație fiziopatologică importantă [13].

Datorită faptului că poate fi colectată neinvaziv în cantități mari, urina reprezintă o sursă de biomarkeri ideală [13,34] în vederea evaluării rolului acestora în diagnosticul și clasificarea nefropatiilor. Noi biomarkeri vor ajuta la accelerarea dezvoltării de noi opțiuni terapeutice pentru nefropatiile de diverse etiologii [1].

Studii recente au evidențiat adevărata complexitate a urinei normale, utilizând spectrometre de masă sensibile. S-a evidențiat că urina conține sute de proteine, unele din ele în concentrație scăzută, precum proteine membranare integre sau elemente de fază solidă, care rămân în supernatant la viteze de centrifugare standard, dar care sedimentează prin ultracentrifugare [35].

De asemenea s-au identificat variate tipuri de ARN mesager și micro ARN în stare inactivă, dar care au potențial de activare când exosomii sunt transfectați în celulele din vecinătate. Profilul expresiei exosomale a micro ARN-urilor ar putea avea rol diagnostic și terapeutic în variate afecțiuni. Datorită aprofundării studiului exosomilor în ultimii ani și a cantității crescânde de informații legate de compoziția acestora, s-a ivit necesitatea creării unei baze de date publice, care să centralizeze și să actualizeze periodic informațiile legate de exosomi. În acest sens a fost creat un compendiu, denumit ExoCarta în care sunt catalogate: numărul de studii care implică exosomii, numărul proteinelor, a ARN mesager și a micro ARN exosomale identificate precum și numărul organismelor, a tipurilor celulare și a fluidelor biologice din care au fost izolați exosomi [36].

S-a reușit izolarea unor proteine asociate cu diverse nefropatii din fracțiunea exosomală a urinei, susținându-se astfel ipoteza că analiza proteomică a exosomilor ar putea reprezenta o cale de descoperire de biomarkeri urinari utili în detecția precoce și monitorizarea tratamentului nefropatiilor [1].

Exosomii urinari conțin aproximativ 3% din totalitatea proteinelor urinare excretate de către subiecții sănătoși, deci prin izolarea exosomilor se obține concentrarea de peste 30 de ori a proteinelor lor constitutive. Astfel crește detectabilitatea unor proteine rare, care ar putea avea valoare diagnostică specifică [37].

Este cunoscut faptul că nivelul proteinelor abun-

dente precum albumina, transferina și  $\alpha 1$  antitripsina este crescut în glomerulopatii. Acestea le lipsește însă specificitatea diagnostică și prin abundența lor împiedică evidențierea proteinelor cu concentrație redusă, mai ales în cazul glomerulopatiilor. Astfel s-a emis ipoteza conform căreia proteinele urinare cu concentrație redusă ar reprezenta ținte mai bune în descoperirea de noi biomarkeri [38].

Utilizarea metodelor bazate pe spectrometrie în cercetarea nefrologică în vederea descoperirii de biomarkeri potențiali pentru glomerulopatiile idiopatice a condus la analiza posibilității de diferențiere a trei tipuri de glomerulopatii idiopatice – glomerulopatia cu leziuni minime (GPLM), glomerulopatia membranară (GPM) și glomeruloscleroza focală (GSFS) și segmentală pe baza paternului de distribuție a proteinelor mici și a peptidelor urinare [26].

S-a observat că aquaporina 2 este eliminată în urină prin intermediul exosomilor și reprezintă un marker sensibil în diagnosticul a variate tulburări ale balanței hidrice, precum diabetul insipid [39,40].

O aplicație potențială a exosomilor ca și biomarkeri este reprezentată de boala polichistică renală [37], cea mai frecventă nefropatie genetică care progresează spre insuficiență renală cronică. În fracțiunea exosomală sunt concentrate policistina 1 și fibrocistina/poliductina, proteine dificil de detectat în țesutul renal adult normal [23].

Analiza exosomilor urinari este de asemenea utilă în sindromul Batter de tip I, cauzat de mutații în gena care codifică cotransportorul Na-K-Cl, unde imunoblotul evidențiază absența benzilor proteice corespunzătoare transportorului. Astfel, analiza exosomilor urinari prin spectrometrie de masă și imunoblot poate furniza informații privind boli genetice care implică proteinele membranare apicale [27].

S-a observat că isoforma 3 a canalului de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE3), cel mai abundent transportor apical de sodiu în tubul renal, a crescut în fracțiunea exosomală a pacienților cu insuficiență renală acută (IRA) prerenală și a fost de 6 ori mai crescută la pacienții cu necroză tubulară acută. Proteina a fost absentă în urina subiecților de control, iar nivelurile acestei proteine nu au crescut la pacienții cu IRA intrinsecă, alta decât necroza tubulară acută. Acest studiu preliminar sugerează că NHE3 exosomală urinară ar putea reprezenta un nou biomarker sensibil și specific pentru leziunea tubulară în IRA și că ar fi un marker util pentru diferențierea necrozei tubulare acute, a IRA prerenale și a IRA intrinseci, alta decât necroza tubulară acută [41].

S-a evidențiat că Fetuina-A urinară exosomală este crescută semnificativ la pacienții cu IRA comparativ cu lotul de control și că este crescută doar în faza precoce a IRA experimentală indusă de cisplatină sau ischemie/reperfuzie, dar nu este crescută la modelele de IRA prin depleție volemică [38].

Zhou et al. au observat că factorul de transcripție

ATF3 crește precoce în IRA, înainte de apariția leziunilor tubulare și poate fi detectată doar în fracțiunea exosomală a urinii, dar nu în urina nefracționată. Astfel ATF3 ar putea reprezenta un nou marker pentru detecția precoce a IRA [6].

### **Rolul exosomilor urinari ca sursă de biomarkeri în nefropatiile glomerulare**

În cazul nefropatiilor glomerulare s-a evaluat rolul de biomarker al Wilm's tumour 1 (WT-1) și al podocalixinei exosomale.

WT-1 este un factor de transcripție necesar maturării podocitare, dar care rămâne exprimat și în celulele mature. Factorii de transcripție sunt implicați în dezvoltarea celulelor, care pot dobândi în cursul agresiunii prin intermediul lor un fenotip dediferențiat. Podocitele sunt celule epiteliale înalt diferențiate, care contribuie la selectivitatea barierei de filtrare glomerulară.

Mutațiile dominante ale genei care codifică WT-1 cauzează apariția tumorii Wilms (nefroblastomul), precum și o serie de podocitopatii: sindromul Denys Drash, sindromul Fraiser și scleroza mezangială difuză izolată. WT-1 este utilizat adesea ca și marker molecular pentru podocite diferențiate, expresia sa scăzând în variate glomerulopatii umane și experimentale în care se produce agresiune asupra podocitelor. Podocitele sunt lezate în majoritatea glomerulopatiilor primare sau secundare, incluzând: GSFS, GPM, glomerulonefrita membrano-proliferativă, amiloidoza și nefropatia diabetică.

Leziunea podocitară este evaluată în prezent prin examinarea biopsiei renale în microscopie electronică. Metode noninvasive de cuantificare a leziunilor podocitare, precum detecția podocituriei, a ARNm WT-1 urinar și a proteinelor asociate podocitelor în sedimentul urinar se află în prezent în curs de dezvoltare. Oricum, cuantificarea podocitelor urinare este dificilă din motive tehnice, iar nivelurile ARNm WT-1 urinar și a podocalixinuriei au o variabilitate prea mare pentru a diferenția între fiziologic și patologic.

Zhou et al. au examinat comportamentul WT-1 la pacienți cu GSFS și două modele experimentale de podocitopatii: GSFS și glomerulopatia colabantă.

WT-1 urinară a fost detectată mai precoce decât apariția proteinuriei și mult mai precoce decât leziunile histologice glomerulare la animalele cu GSFS. WT-1 urinară s-a detectat la pacienții cu GSFS, dar nu și în urina subiecților din lotul de control. Ca și în cazul ATF3, factorul de transcripție WT-1 a fost detectat doar în fracțiunea exosomală a urinii, fiind absent în urina totală. S-a mai observat că WT-1 urinară a crescut la ambele modele experimentale, în timp ce concentrația tisulară era în scădere, sugerând astfel că exosomii sunt eliberați din podocite lezate. Nu s-a elucidat dacă eliberarea exosomilor se produce din podocite mai puțin afectate de agresiune, care sunt responsabile de nivelurile tisulare scăzute sau din

podocite dediferențiate atașate în continuare de membrana bazală glomerulară (MBG) sau dacă podocitele lezate se detașează de pe MBG și eliberează apoi exosomii. Oricum, toate aceste observații sugerează că WT-1 urinară exosomală ar putea reprezenta un biomarker util pentru detecția precoce a leziunilor podocitare [6].

Un studiu a evidențiat că podocalixina urinară – marker cunoscut pentru membrana podocitară apicală, a fost prezentă în preparatul exosomal și a avut concentrații semnificativ mai reduse la pacienții cu GSFS comparativ cu voluntarii sănătoși [32].

### **Bariere și limite în analiza exosomilor urinari**

Înainte ca analiza proteomică a exosomilor urinari, ca și cale spre descoperirea de biomarkeri pentru nefropatiile glomerulare să poată fi aplicată în clinică, trebuie depășite o serie de bariere importante [5,27]. Acestea sunt reprezentate de:

- absența unor protocoale standardizate pentru colectarea, procesarea și stocarea probelor urinare în vederea efectuării unor măsurători reproductibile în orice laborator clinic [1,25,42];

- necesitatea ultracentrifugării probelor, proces care necesită aparatură costisitoare și timp îndelungat de procesare - ca și alternativă de izolare a exosomilor s-au propus metode bazate pe filtrare;

- necesitatea îndepărtării proteinei Tamm-Horsfall (uromodulina), care se află în cantități mari în concentratul exosomal și interferează cu spectrometria de masă și cu imunoblotul. Proteina Tamm Horsfall este cea mai abundentă proteină urinară în condiții fiziologice, prezentă sub formă polimerică asamblată în filamente. S-a observat că un număr semnificativ de exosomi rămân prinși între aceste filamente în cursul centrifugării, iar cantitatea finală de exosomi izolați este redusă [27]. Recent s-a constatat că prin utilizarea ditiotrietolului în cursul centrifugării se distrug filamentele care rețin exosomii, iar cantitatea recuperată în final crește semnificativ [43].

Totuși, cea mai mare provocare tehnică este reprezentată de dezvoltarea unor metode de cuantificare a biomarkerilor candidați în vederea detectării modificărilor ratei de excreție a acestora. În prezent se utilizează raportarea la creatininurie, care este însă inadecvată datorită variabilității interindividuale mari a ratei de excreție [27]. Recent s-a evidențiat că există o corelație semnificativă între cantitatea de proteină Tamm-Horsfall și cantitatea de markeri proteici exosomal, astfel uromodulina ar putea fi utilizată ca și variabilă de normalizare a probelor din spotul urinar [43].

### **Concluzii**

Analiza exosomilor urinari poate furniza informații importante legate de procesele fiziologice și fiziopatologice care au loc la nivelul podocitelor. Ca și orice metodă nouă de investigare prezintă avantaje și limite, care trebuie

depășite înainte de aplicarea analizei acestei fracțiuni urinare în laboratorul clinic. Datorită modului neinvaziv de colectare a probelor, precum și datorită cantității mari de informații conținută în veziculele urinare – analiza acestora este de mare actualitate în cercetarea nefrologică.

# Bibliografie

1. Zhou H, Yuen PST, Pisitkun T, et al. **Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery.** *Kidney Int* 2006; 69(8): 1471-1476
2. Li XB, Zhang ZR, Schluesener HJ, Xu SQ. **Role of exosomes in immune regulation.** *J Cell Mol Med* 2006;2:364-375
3. 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;262:9412-9420
4. Keller S, Rupp C, Stoeck A, et al. **CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid.** *Kidney Int* 2007;72:1095-1102
5. Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, et al. **Prospects for urinary proteomics: Exosomes as a source of urinary biomarkers.** *Nephrol* 2005;10:283-290
6. Zhou H, Cheruvanky A, Hu X, et al. **Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease.** *Kidney Int* 2008;74(5):613-621
7. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. **Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function.** *Immunol Lett* 2006;107:102-108
8. Gruenberg J, Stenmark H. **The biogenesis of multivesicular endosomes.** *Nat Rev Mol* 2004;5:317-322
9. Sotelo JR, Porter KR. **An electron microscope study of the rat ovum.** *J Biophys Biochem Cytol* 1959;5:327-342
10. Piper RC, Katzmann DJ. **Biogenesis and function of multivesicular bodies.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:519-547
11. Xiao Z, Blonder J, Zhou M, Veenstra TD. **Proteomic analysis of extracellular matrix and vesicles.** *J Proteomics* 2008;72:34-45
12. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HFG, Stoorvogel W, Geuze J. **Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device.** *J Cell S* 2000;113:3365-3374
13. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. **Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine.** *PNAS* 2004;101(36):13368-13373
14. Van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. **Exosomes: A common pathway for a specialized function.** *J Biochem* 2006;140:13-21
15. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. **Ubiquitin dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of the conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I.** *Cell* 2001;106:145-155
16. Woodman P, Futter C. **Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity.** *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:408-414
17. Raposo G, Tenza D, Mecheri S, et al. **Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation.** *Mol Biol Cell* 1997;8:2631-2645
18. Savina A, Fader CM, Damiani MT, et al. **Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner.** *Traffic* 2005;6:131-143
19. Faure J, Lachenal G, Court M, et al. **Exosomes are released by cultured cortical neurones.** *Mol Cell Neurosci* 2006;31:642-648
20. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. **B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles.** *J Exp Med* 1996;183:1161-1172
21. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. **Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic-cell-derived exosomes.** *Nat Med* 1998;4:594-600
22. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. **Exosomes: composition, biogenesis and function.** *Nature Reviews* 2002;2:569-579
23. Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, et al. **Characterisation of PKD protein positive exosome-like vesicles.** *J Am Soc Nephrol* 2009;20:278-288
24. Valadi H, Ekstroem K, Bossios A, et al. **Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.** *Nature Cell Biology* 2007;9(6):1-4
25. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE. **Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives.** *Proteomics* 2008;8:4083-4099
26. Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. **Discovery of urinary biomarkers.** *MCP* 2006; 5:1760-1771
27. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, et al. **Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes.** *J Am Soc Nephrol* 2009;20:363-379
28. Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. **Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies.** *Biochemie* 2007;89:205-212
29. De Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. **Lipid raft-associated protein sorting in exosomes.** *Blood* 2003;102:4336-4344
30. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L. **Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes.** *Science* 2008;319:1244-1247
31. Spănu S, Wieland D, Star RA, Floege J, Muehlfeld A. **Metodă de evidențiere a exosomilor urinari în vederea aprecierii rolului lor ca markeri noninvazivi de evaluare a activității nefropatiilor glomerulare.** *Nefrologia* 2009;13:108-109
32. Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, et al. **Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane concentrator.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(5):F1657-F1661
33. Fevrier B, Raposo G. **Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages.** *Current opinion in cell biology* 2004;16:415-421
34. Dimov I, Velickovic LJ, Stefanovic V. **Urinary exosomes.** *The Scientific World Journal* 2009;9:1107-1118
35. Knepper MA, Pisitkun T. **Exosomes in urine: who would have thought...?** *Kidney Int* 2007;72:1043-1045
36. Mathivanan S, Simpson RJ. **ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA.** *Proteomics* 2009;9:4997-5000
37. Gonzales P, Pisitkun T, Knepper MA. **Urinary exosomes: is there a future?** *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:1799-1801
38. Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, et al. **Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury.** *Kidney Int* 2006;70:1847-1857
39. Kanno K, Sasaki S, Hirat Y, et al. **Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus.** *N Engl J Med* 1995;332:1540-1545
40. Elliot S, Goldsmith P, Knepper M, Haughey M, Olson B. **Urinary excretion of aquaporin-2 in humans: a potential marker of collecting duct responsiveness to vasopressin.** *J Am Soc Nephrol* 1996;7:403-409
41. Du Cheyron D, Daubin C, Poggioli J, et al. **Urinary measurement of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 (NHE3) protein as**

new marker of tubule injury in critically ill patients with ARF. Am J Kidney Dis 2003;42(3):pp497-506

42. Michell PJ, Welton J, Stffurth J, et al. Can urinary exosomes as treatment response markers in prostate cancer?. J Transl Med 2009;7:4

43. Lama PF, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, Pisitkun T, Knepper MA. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. Kidney Int 2010. Available from: URL: <http://www.nature.com/ki/journal/vaop/ncurrent/abs/ki2009550a.html>