

# Difetti nel metabolismo del glucosio nel rene policistico: primi studi e prospettive future

Isaline Rowe, Marco Chiaravalli, Alessandra Boletta

Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Istituto Telethon Dulbecco (DTI) presso Ospedale San Raffaele, Milano

## DEFECTS OF GLUCOSE METABOLISM IN POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE: FIRST STUDIES AND FUTURE PERSPECTIVES

**Abstract.** Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) is a common genetic disorder characterized by bilateral renal cyst formation. Several aspects of the genetic and molecular mechanisms underlying cyst formation in this disease are still controversial, but there is today general agreement on ADPKD being a loss-of-function disease. In this brief article we specifically discuss 2 aspects: (i) we try to give an overview of the state-of-the-art of our current understanding of the genetic and molecular basis of the disease, trying to provide an integrated view of the different models of cystogenesis proposed; (ii) we provide a detailed description and a discussion of the recent findings reported by our laboratory on defective glucose metabolism in ADPKD and its potential therapeutical implications, highlighting also the need for further validation of our findings in additional animal models of late onset and slow progression.

**Key words:** Polycystic kidney disease, Glucose, Cilia, Cyst

**Conflict of interest:** The authors have filed a US provisional patent application on July 3, 2012 for the use of inhibitors of glycolysis in polycystic kidney disease.

**Financial support:** AB: Fondazione Telethon (TCR05007), MC: Italian Polycystic Kidney Disease Association (AIRP).

Ricevuto: 10 Maggio 2013; Accettato: 13 Maggio 2013

## ADPKD: genetica e meccanismi proposti di cistogenesi

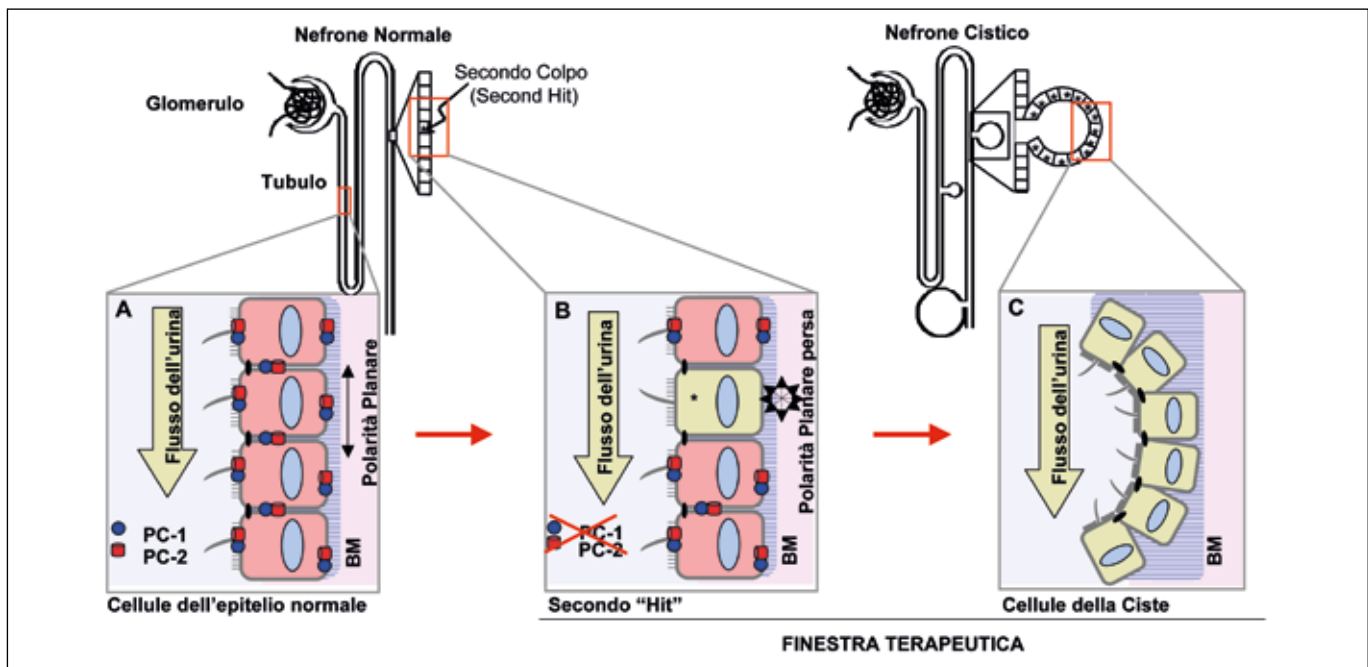
La malattia autosomica dominante del rene policistico (ADPKD) è una malattia genetica frequente, che colpisce tra 1:500 e 1:1000 soggetti nella popolazione generale (1-3). Il segno distintivo della malattia è la formazione di cisti renali bilaterali, anche se la malattia è sistemica, in quanto si presenta con numerose manifestazioni extra-renali. Queste includono cisti nel fegato e nel pancreas, così come complicanze cardiovascolari (per la revisione degli aspetti clinici della malattia, vedi nota 2). Due geni sono stati collegati a questa malattia: *PKD1*, che è mutato nell'85% dei casi, e *PKD2*, che è mutato nella maggior parte dei casi restanti. Numerose mutazioni sono state segnalate lungo la lunghezza di questi due geni; la maggior parte è costituita da mutazioni con perdita di funzionalità (3). Studi di mutazioni hanno sempre riportato la mancanza di una correlazione genotipo-fenotipo, ma uno studio recente effettuato su un numero elevato di pazienti (742) ha dimostrato che mutazioni troncanti nel gene *PKD1* portano a una perdita della funzionalità renale molto più precoce di quanto non si verifichi in pazienti con mutazioni missenso (4). Pazienti con mutazioni nel gene *PKD2* hanno una progressione della malattia meno aggressiva di entrambe le categorie di pazienti con mutazioni nel gene *PKD1*, come precedente-

mente riportato (4). Infine, studi più recenti hanno dimostrato l'esistenza di famiglie con trasmissione biallelica di mutazioni poco aggressive, aprendo una serie di nuove prospettive genetiche (5, 6).

In questo articolo ci limiteremo a discutere due aspetti: 1) una breve descrizione dello stato dell'arte di quanto si sa o si ipotizza circa i potenziali meccanismi genetici e/o molecolari che stanno alla base della formazione di cisti nella ADPKD; 2) la descrizione e la discussione dei risultati recentemente ottenuti dal nostro gruppo circa una disfunzione nel metabolismo del glucosio che abbiamo osservato nella malattia policistica renale e che potrebbe aprire interessanti prospettive terapeutiche (7). Rimandiamo ad altri lavori per tutta l'estesa letteratura che copre diversi altri aspetti riguardanti la biologia cellulare che sta alla base della patologia o gli aspetti più clinici.

## Meccanismi genetici della cistogenesi

La ADPKD è ereditata in modo autosomico dominante, ma si suggerisce che sia recessiva a livello molecolare (8). Analisi di cellule dell'epitelio derivate da cisti renali o epatiche hanno rivelato che l'allele ereditato normale subisce una mutazione somatica, con la conseguente perdita in omozigosi del gene *PKD1* o *PKD2* (8). Questo "secondo colpo (*Second Hit*)" a danno di una singola cellula epiteliale ne provoca un eccesso



**Fig. 1 - Modello clonale di espansione delle cisti nella ADPKD.** Schema che illustra la formazione focale di cisti a partire da una sola cellula (espansione clonale) a causa di un *Second Hit*. In un epitelio che fianeggia un nefrone normale (A), le cellule sono normalmente distribuite in modo architettonicamente organizzato, con un chiaro asse che definisce la lunghezza del nefrone. In queste cellule, il complesso policistina-1/policistina-2 (PC-1/PC-2) si trova a livello dell'interfaccia cellula-matrice (BM) e cellula-cellula oppure sul ciglio primario. Da quest'ultimo organello, il complesso sarebbe in grado di sentire il flusso della nascente urina e di "orientare" le cellule nello spazio (secondo un programma di polarità detta planare). Quando un evento esterno (B), come una mutazione somatica nell'allele ereditato normale oppure sull'altro dei due geni PKD (causando trans-eterozigosi), o, ancora, altri effetti ambientali portano il livello del complesso PC-1/PC-2 al di sotto di una soglia critica di funzionalità, la singola cellula inizia a espandersi clonalmente (C). Nell'epitelio che fianeggia la cisti si trovano aumentate apoptosi e proliferazione e secrezione di fluidi, probabilmente dovute a un aumento di AMP ciclico intracellulare. Rallentare l'espansione della cisti una volta formata (C) rappresenta un ragionevole approccio terapeutico. Tuttavia, bloccare l'evento iniziale della formazione della cisti (B) rappresenterebbe una vera e propria cura. La nostra comprensione di come questo evento iniziale avvenga è ancora oscura.

di proliferazione che genera una protrusione clonale, che, alla fine, si disconnette dal tubulo renale (Fig. 1). È stato proposto che questa teoria sarebbe in grado di spiegare la natura focale delle cisti nel rene policistico, già descritta da studi di microdissezione su tessuti di pazienti prima che i due geni mutati nella malattia venissero identificati (1, 9). In alcune delle cisti in cui non si è osservata una mutazione omozigote di un gene *PKD* (1 o 2), sono state trovate mutazioni nell'altro gene *PKD*, suggerendo che la trans-eterozigosi dei due geni è sufficiente per indurre la formazione di cisti (10). Sulla base di questi risultati, è stato proposto un "modello a soglia" per la formazione delle cisti, in cui l'eterozigosi non è sufficiente per indurre una cistogenesi renale, ma è necessario un livello minimo di attività dei prodotti genici di *PKD1* e *PKD2*, le policistine (Fig. 1), per evitare la cistogenesi. Quindi, la perdita di funzionalità totale delle policistine non sembra essere necessaria, bensì una qualsiasi disfunzione che porti l'attività delle policistine al di sotto di tale soglia potrebbe portare alla formazione di cisti (Fig. 1). Come detto sopra, un recente studio ha identificato famiglie ADPKD che portano mutazioni lievi nel gene *PKD1* con trasmissione omozigote, che sfociano nella ADPKD; questa scoperta suggerisce ulteriormente

che la quantità di prodotto genico o della sua funzione potrebbe essere importante (5, 6). Quindi, la perdita di funzione (totale o parziale) dei geni *PKD1* e *2* sembra essere il meccanismo più comune alla base della causa di cistogenesi renale nella ADPKD.

Infine, sebbene l'aplo-insufficienza non sembri essere il meccanismo che spiega la cistogenesi, è altamente probabile che essa sia la causa di alcune delle altre manifestazioni sistemiche e non focali della malattia, come alcuni dei difetti cardiovascolari o dei difetti di insulino-resistenza. Evidenze da modelli murini e da modelli cellulari sembrano supportare questa idea (11, 12).

### Meccanismo/i molecolare/i di cistogenesi

Gli studi sopramenzionati fanno emergere con forza il fatto che la perdita di funzione sia il meccanismo più comune alla base della formazione della cisti, ma come può una mancanza del prodotto genico della PKD (1 o 2) dare luogo alla cistogenesi? Come detto sopra, un'abbondante letteratura è stata pubblicata in merito alla caratterizzazione degli epitelii cistici dei reni ADPKD, anche ben prima che i due geni implicati

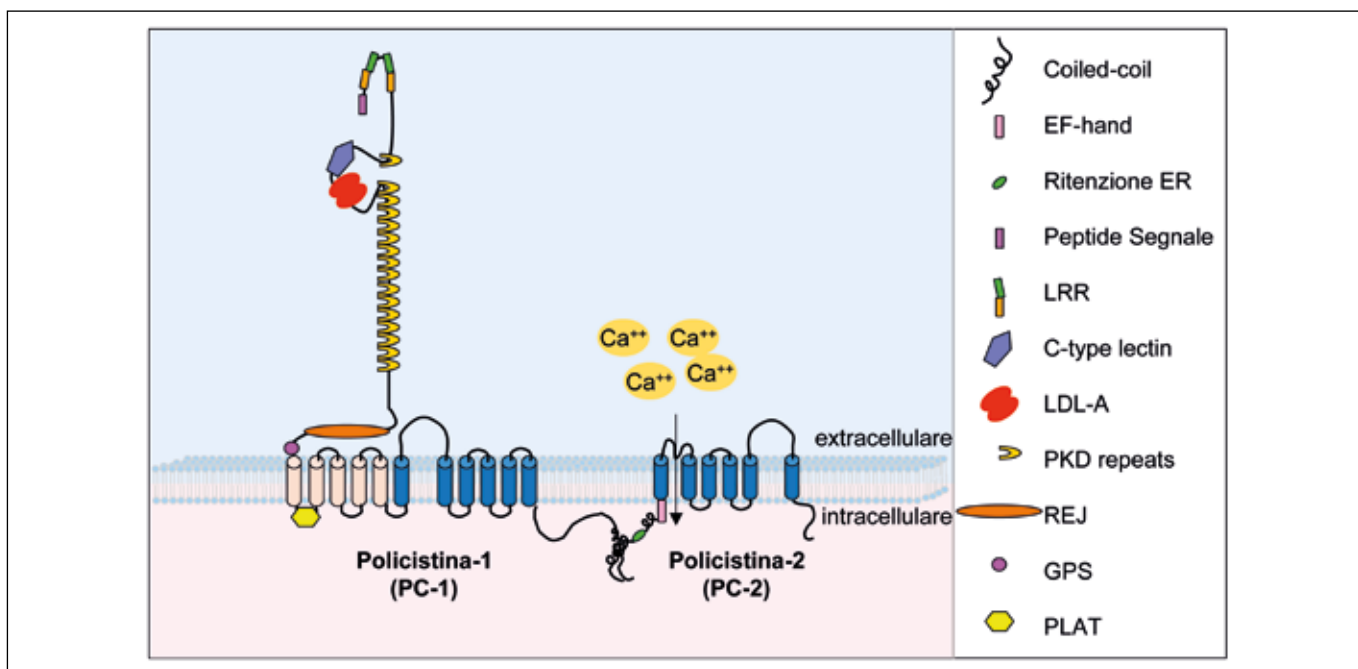


Fig. 2 - La struttura della polycistina-1 (PC-1) e della polycistina-2 (PC-2). La PC-1 è un recettore di membrana di 4302 amminoacidi, con una porzione N-terminale extracellulare di 3000 amminoacidi, 11 domini transmembrana e 1 coda intracellulare di 198 amminoacidi. Il peso molecolare stimato è di 462 kDa. La PC-2 è un canale del calcio di 968 amminoacidi, contenente 6 domini transmembrana, con entrambe le code N- e C-terminali rivolte verso il citoplasma. Le due proteine interagiscono tramite i loro domini *coiled-coiled* intracellulari e si ritiene funzionino insieme in un complesso. Questo spiegherebbe il fenotipo molto simile osservato in pazienti con mutazioni nel gene *PKD1* oppure nel gene *PKD2*.

venissero identificati (1, 9).

La successiva generazione di modelli murini che mimano la malattia ha consentito la conferma di alcune delle osservazioni originariamente svolte su tessuti umani. Questi studi nel loro insieme hanno contribuito a creare un consenso generale su alcune caratteristiche chiave di questi epiteli: 1) sembra esserci un difetto nella deposizione della matrice, con ispessimento della membrana basale (13); 2) è stato costantemente osservato nell'uomo e in campioni murini un aumento della morte cellulare per apoptosi (14); 3) la proliferazione sembra essere accelerata negli epiteli cistici, anche se in misura lieve, provocando una lenta espansione degli epiteli stessi nel tempo (1); 4) vi è, inoltre, una maggiore secrezione di fluido verso il lume della cisti, dovuta principalmente alla produzione di AMP ciclico (15). Sulla base di tutti questi studi, attualmente, i farmaci che interferiscono sulla proliferazione o sulla produzione di AMP ciclico (e sulla secrezione di fluidi) sono considerati gli approcci più promettenti per rallentare l'espansione delle cisti e diversi sono attualmente in fase di sperimentazione in studi clinici (2, 16).

### Policistine, ciglia e polarità planare

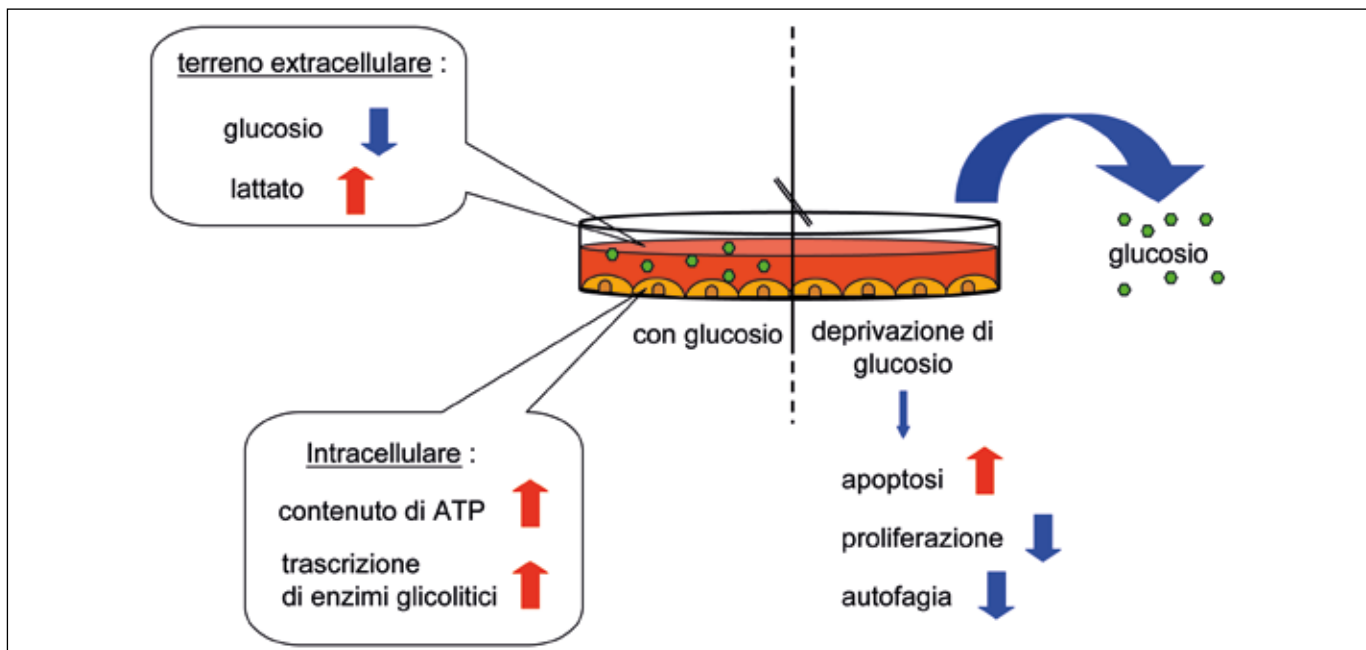
Una proliferazione e una secrezione maggiori potrebbero in parte spiegare il meccanismo coinvolto nell'espansione delle cisti e forniscono un importante razionale per disegnare approcci terapeutici volti almeno a rallentare il progredire della patologia, se non a correggerne il difetto. Tuttavia, questi fat-

tori non spiegano come inizialmente abbia origine una cisti, la cui comprensione potrebbe invece portare all'identificazione di una vera e propria cura in grado di correggere il difetto all'origine della formazione stessa delle cisti. Lo studio della funzione normale di due prodotti genici di *PKD1* e *PKD2*, la polycistina-1 (PC-1) e la polycistina-2 (PC-2), rispettivamente, potrebbe aiutare a trovare qualche nuovo e fondamentale tassello per completare questo complicato *puzzle*.

La PC-1 è un grande recettore di membrana, con un'enorme porzione N-terminale extracellulare contenente una nuova combinazione di domini che mediano l'interazione proteina-proteina, 11 domini transmembrana e una breve coda intracellulare (17-19) (Fig. 2). La polycistina-2 (PC-2, chiamata anche TRPP2) è una proteina di membrana di 968 aa, contenente 6 domini transmembrana, con entrambe le code N- e C-terminali rivolte verso il citoplasma (17, 19) (Fig. 2). La PC-2 è omologa alla famiglia di Recettori del Potenziale Transiente (TRP) e in linea con questo è stato dimostrato che agisce come un canale del calcio (17, 19).

PC-1 e PC-2 interagiscono tramite un dominio *coiled-coil* contenuto nella loro coda citoplasmatica C-terminale (Fig. 2). Il complesso PC-1/2 sulla membrana citoplasmatica è stato localizzato nelle giunzioni cellula-cellula, nelle adesioni focali che mediano l'interazione cellula-matrice e sulle ciglia primarie (Fig. 1) (17, 19).

Le ciglia primarie sono delle strutture microtubulari sottili e lunghe e non mobili, che protrudono da molti tipi di cellule differenti. Nelle cellule epiteliali ed endoteliali in cui si sviluppa



**Fig. 3 -** Cellule mancanti del gene *Pkd1* utilizzano la glicolisi aerobia (Warburg effect). Schema grafico che riassume i risultati ottenuti su cellule prive del gene *Pkd1* funzionante. L'aumentata glicolisi in cellule *Pkd1*<sup>-/-</sup> risulta nell'alterazione dei prodotti di scarto e di consumo contenuti nel loro terreno di crescita, con il conseguente aumento del contenuto intracellulare di energia (ATP) e un'aumentata trascrizione di enzimi glicolitici rispetto a cellule normali di controllo. Quando le cellule *Pkd1*<sup>-/-</sup> vengono deprivate del glucosio si osserva un'elevata morte cellulare, favorita dalla mancanza di autofagia, con la conseguente diminuzione della proliferazione cellulare.

una polarità apico-basale, le ciglia appaiono sul lato apicale, dove si ritiene siano degli importanti sensori-meccanici che rispondono al flusso (17, 19, 20) (Fig. 1). Numerose evidenze suggeriscono che, nelle cellule epiteliali renali ed endoteliali, entrambe le policistine si localizzano sul ciglio, dove la PC-1 agisce come sensore-meccanico (17, 19, 20), probabilmente in virtù del suo lungo dominio N-terminale (Fig. 1). Rimane da stabilire quale sia la funzione a valle di questa attività di sensore del piegamento del ciglio. Tuttavia, PC-1 e PC-2 sono state correlate a numerose potenziali funzioni biologiche. Per entrambe, è stata dimostrata una funzione di protezione delle cellule dall'apoptosi in diverse condizioni di *stress* (21, 22). Inoltre, è stato dimostrato che il complesso PC-1/2 inibisce la proliferazione cellulare attraverso l'attivazione di diverse cascate del segnale.

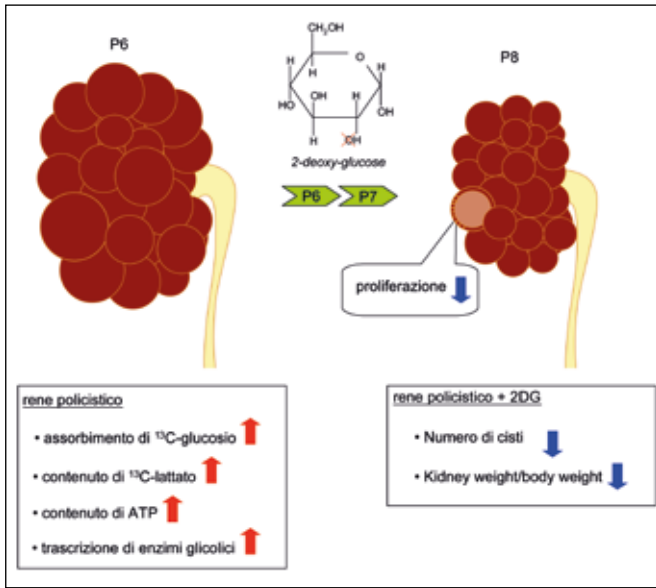
Nonostante i numerosi studi che hanno permesso l'avanzamento della comprensione dei diversi aspetti descritti sopra, il legame fra la funzione delle policistine, la loro localizzazione nelle ciglia primarie e la formazione delle cisti rimane a oggi ampiamente sconosciuto. In particolare, non è noto quale sia il meccanismo preciso per cui una cellula del tubulo renale inizi a espandersi e formi le cisti quando vi è una mancata funzione delle policistine e, presumibilmente, delle ciglia primarie (Fig. 1). Recentemente, è stata sollevata un'ipotesi molto interessante, che afferma che la polarità planare delle cellule (PCP) del tubulo renale potrebbe essere affetta in alcune malattie cistiche renali e potrebbe rappresentare il difetto d'origine (23). Questa ipotesi è supportata da molteplici evidenze, anche se il legame con le policistine rimane sconosciuto o, al più, contro-

verso, e ulteriori studi sono necessari per comprenderne meglio le basi molecolari (24, 25). Rimandiamo ad altri articoli per un approfondimento.

#### *Un difetto a livello del metabolismo del glucosio nella ADPKD e conseguenti prospettive terapeutiche*

La ADPKD è una malattia cronica progressiva. Le cisti si formano a partire da qualsiasi tratto del tubulo renale, ma solo nell'1-5% dei nefroni. Pertanto, questa condizione di per sé potrebbe essere compatibile con una normale funzione renale. Sappiamo, infatti, che vi è una grande ridondanza funzionale nel rene, che consente a individui con un solo rene (quindi con una riduzione del 50% di nefroni) di filtrare il sangue regolarmente (2). Tuttavia, la progressiva espansione delle cisti comprime e sostituisce alla fine il tessuto normale, causando una perdita di funzionalità renale nella maggioranza dei pazienti. Quindi, anche se ancora non si conoscono i dettagli dei meccanismi con cui le cisti si formano, gli interventi terapeutici mirati a ridurre l'espansione delle cisti sono a buon diritto attualmente considerati potenziali buoni approcci per ritardare la malattia renale (2).

Come detto, anche se ancora non si capisce come si formi inizialmente una cisti, sappiamo che la ADPKD è causata dalla perdita della funzione di uno dei due geni: *PKD1* o *PKD2*. Quindi, per studiare le alterazioni causate da un difetto di funzione di *PKD1*, abbiamo isolato cellule di topo (*Mouse Embryonic Fibroblast*, MEF) da topi che portano due alleli



**Fig. 4** - L'utilizzo di 2DG ha un effetto benefico su modelli murini di ADPKD. I reni murini ADPKD presentano alterazioni nel metabolismo aerobio del glucosio. Quando il glucosio portante 6 atomi di carbonio marcati con  $^{13}\text{C}$  veniva iniettato sottocute in modelli murini di PKD, si notava un aumentato assorbimento di glucosio e una sua conversione in lattato nei reni policistici. Il trattamento con 2DG per soli due giorni (giorno Postnatale 6, P6, e giorno Postnatale 7, P7) causa un numero e delle dimensioni ridotti delle cisti, quando analizzate a P8, portando a una riduzione finale del peso dei reni confrontati con i reni ADPKD di animali non trattati in due modelli murini ADPKD ortologhi. Inoltre, si osserva una ridotta proliferazione delle cellule che rivestono la cisti e questo, probabilmente, spiega il risultato osservato.

normali del gene *PKD1* (*Pkd1*<sup>+/+</sup>) o da topi che portano due alleli mutati di *PKD1* (*Pkd1*<sup>-/-</sup>, mancanti interamente della funzione del gene). Utilizzando queste cellule, casualmente abbiamo identificato un nuovo processo alterato nel rene policistico, che potrebbe essere facilmente inibito con approcci farmacologici (7).

*Aumento della glicolisi aerobia nelle cellule Pkd1<sup>-/-</sup>*

Le cellule vengono normalmente tenute in coltura in un terreno che fornisce nutrimenti e che porta al suo interno un misuratore colorimetrico del pH extracellulare. Il terreno è di colore rosso chiaro quando il pH è neutro, mentre diventa giallo quando è molto acido. Durante la coltivazione delle cellule *Pkd1*<sup>-/-</sup>, abbiamo notato che il terreno risultava essere sempre molto acidificato (giallo) rispetto ai controlli. Questo ci ha fatto ipotizzare che potessero avere un metabolismo più elevato. Testando l'ipotesi abbiamo osservato che effettivamente le cellule *Pkd1*<sup>-/-</sup> avevano un contenuto molto più elevato di ATP rispetto ai controlli, suggerendo una produzione e un utilizzo di energia maggiori da parte di queste cellule (Fig. 3) (7). Per determinare quali vie metaboliche fossero alterate in queste cellule, abbiamo utilizzato un approccio di metabolomica,

applicando la risonanza magnetica nucleare (NMR) per effettuare un "profiling" di tutti i metaboliti presenti in un dato campione in modo quantitativo (26). Utilizzando questa tecnica per analizzare il terreno in cui crescevano cellule *Pkd1*<sup>+/+</sup> rispetto a quello delle cellule *Pkd1*<sup>-/-</sup>, abbiamo identificato diversi metaboliti alterati nelle due condizioni. In particolare, le alterazioni più importanti trovate erano la ridotta quantità di glucosio e un aumento delle concentrazioni di lattato nel terreno (Fig. 3). Questi dati suggeriscono che le cellule *Pkd1*<sup>-/-</sup> utilizzano la glicolisi aerobia, in un processo simile all'effetto Warburg riscontrato in diversi tipi di cellule tumorali (27). In effetti, la privazione del glucosio abrogava il maggiore contenuto di ATP in cellule *Pkd1*<sup>-/-</sup> (Fig. 3). Dal momento che il metabolismo del glucosio è la principale fonte di energia della cellula e che esso, normalmente, in presenza di ossigeno, viene consumato attraverso la fosforilazione ossidativa che si verifica nei mitocondri, abbiamo analizzato il potenziale di membrana mitocondriale nelle cellule *Pkd1*<sup>+/+</sup> e *Pkd1*<sup>-/-</sup> e i risultati non hanno evidenziato alterazioni a questo livello. In linea con questo, il trattamento con oligomicina, un inibitore dell'enzima mitocondriale ATP-sintetasi, diminuiva il contenuto di ATP nelle cellule parentali, ma aveva solo un effetto minimo in cellule *Pkd1*<sup>-/-</sup> (7).

*Le cellule mutate nel gene Pkd1 dipendono dal glucosio per la propria proliferazione e la propria sopravvivenza*

Abbiamo poi testato se l'aumento del metabolismo del glucosio contribuiva a de-regolare la proliferazione o l'apoptosi cellulare. Abbiamo notato che la deprivazione di glucosio ripristinava l'indice di proliferazione in cellule *Pkd1*<sup>-/-</sup> (7) (Fig. 3). Inoltre, mentre le cellule *Pkd1*<sup>+/+</sup> private di glucosio attivavano l'autofagia cellulare e, conseguentemente, sopravvivevano per periodi lunghi, le cellule *Pkd1*<sup>-/-</sup> non riuscivano ad attivare questa via catabolica e, conseguentemente, presentavano tassi apoptotici più alti (Fig. 3). Infine, abbiamo osservato che le alterazioni metaboliche dipendevano dalla cascata di mTORC1, che agisce aumentando la trascrizione dei geni della via glicolitica e inibendo l'attività di un importante sensore energetico della cellula, l'AMPK (AMP-activated kinase, chinasi attivata da AMP) (7).

*Aumento della glicolisi aerobia in modelli murini di PKD e in tessuti di pazienti*

Per verificare se questa elevata attività della glicolisi fosse effettivamente importante nel rene policistico *in vivo*, abbiamo analizzato i reni policistici estratti da un modello murino che porta inattivazione del gene *Pkd1* solo nel rene stesso (*Pkd1*<sup>flox/flox</sup>:*Ksp-Cre*) (7). Questo è un modello murino particolarmente aggressivo, perché l'inattivazione del gene *Pkd1* avviene durante lo sviluppo embrionale, tuttavia rappresenta un modello ortologo (mutato nello stesso gene *PKD1* mutato nella maggioranza dei pazienti con ADPKD) e rappresenta, quindi, un modello fedele di patogenesi. Nei reni policistici di questi animali, abbiamo identificato un aumentato assorbimento di glucosio (dopo somministrazione di una molecola di glucosio in cui ogni carbonio era sostituito

con un carbonio  $^{13}\text{C}$ , in modo da poterlo tracciare per NMR) e un' aumentata produzione di lattato, proprio a partire da questo glucosio (facilmente tracciabile grazie al  $^{13}\text{C}$ ) (Fig. 4). Infine, abbiamo analizzato dei campioni di rene policistico derivati da pazienti portanti mutazioni nel gene *PKD1* e, in questo caso, abbiamo analizzato il profilo di espressione genica in questi tessuti. Abbiamo verificato che nel paziente vi è un' aumentata espressione genica di enzimi che sono essenziali per la regolazione della glicolisi, mentre sono diminuiti i geni che codificano per enzimi coinvolti nella neoglucogenesi, il processo inverso, a suggerire che simili alterazioni avvengono anche nel tessuto dal paziente (7).

Tutti questi dati nel loro insieme suggeriscono che il gene *PKD1* regola la glicolisi aerobia (effetto *Warburg*) e che molecole in grado di bloccare il funzionamento potrebbero essere utilizzate per bloccare la crescita o la sopravvivenza delle cellule che formano la cisti nel paziente con ADPKD.

#### *Interferendo con la glicolisi si rallenta l'espansione delle cisti in due modelli murini di PKD*

Per testare la potenziale efficacia di molecole in grado di interferire con la glicolisi abbiamo utilizzato lo stesso modello murino di rene policistico descritto sopra, che porta l'inattivazione del gene *Pkd1* solo nel rene e che, pertanto, sviluppa il rene policistico. Abbiamo somministrato al topo un analogo del glucosio (2-deossi glucosio, 2DG), che viene riconosciuto e assorbito dalla cellula come se fosse glucosio, ma che non può essere metabolizzato interferendo, quindi, con la glicolisi (Fig. 4) (7). Utilizzando 2DG per soli due giorni di trattamento (a un dosaggio di 500 mg/Kg il giorno Postnatale 6 e il giorno Postnatale 7), abbiamo visto che questa sostanza è in grado di diminuire in modo significativo il peso totale del rene, il numero delle cisti e la proliferazione delle singole cellule che fiancheggiano le cisti stesse (Fig. 4) (7). Inoltre, abbiamo osservato che, trattando con questo composto, si ha un aumento del parenchima renale che si mantiene normale e, quindi, presumibilmente funzionante. Simili risultati sono stati ottenuti in un secondo modello murino in cui il gene *Pkd1* porta una singola alterazione aminoacidica puntiforme che sviluppa un rene policistico meno aggressivo, quando in omozigosi (il modello *Pkd1<sup>Y/Y</sup>*) (28). Anche in questo modello, un simile regime di trattamento ha generato risultati comparabili (7).

#### *Prospettive future e domande aperte*

I nostri dati hanno mostrato che effettivamente l'uso di analoghi del glucosio, come il 2DG, potrebbe rappresentare un approccio terapeutico sensato nel rene policistico.

Come detto sopra, il rene è un organo con una grande ridondanza funzionale e la perdita di una piccola percentuale di nefroni non è sufficiente a causarne la perdita funzionale. Come detto, nella ADPKD la formazione delle cisti interessa un numero basso di nefroni (1-5%) (2). Tuttavia, la loro lenta e progressiva espansione negli anni porta a danneggiare il tessuto adiacente e a una perdita della funzionalità renale. Pertanto, l'uso di una molecola in grado di ridurre selettivamente la vi-

talità o la proliferazione delle cellule che rivestono le cisti potrebbe portare a una terapia efficace. Il 2DG potrebbe servire a questo scopo, in quanto è una molecola ben tollerata nell'uomo e già in uso per il trattamento di alcuni tipi di tumore (29). Tuttavia, rimane da dimostrare l'efficacia di questo composto in un modello di malattia con una progressione lenta, simile a quella umana (30), e a un dosaggio simile a quello ben tollerato nell'uomo e per periodi di trattamento molto lunghi (29), come verosimilmente dovrà essere per una terapia volta a curare il rene policistico.

Inoltre, noi ipotizziamo che questa molecola potrebbe essere efficace anche nella diminuzione delle cisti nel fegato, un problema che si manifesta nell'80% dei pazienti e maggiormente presente nelle donne, che, sebbene non dia gravi problemi funzionali, rappresenta spesso un'importante complicanza (2). La nostra ipotesi andrà formalmente testata, ma, se fosse corretta, questo rappresenterebbe un ulteriore vantaggio rispetto ad altri approcci. Infatti, la molecola che attualmente ha dato i migliori risultati in *clinical trial* nel rallentare l'espansione delle cisti nel rene policistico, un antagonista del recettore della vasopressina, non è in grado di agire a questo livello, in quanto il suo *target* molecolare non è espresso in queste cellule (2).

Un'ulteriore interessante considerazione va fatta su possibili approcci di terapie combinate. È stato ampiamente riportato che il trattamento sperimentale con rapamicina ha effetti benefici nel rallentare l'espansione delle cisti in numerosi modelli murini di malattia (31, 32). Tuttavia, i risultati successivamente riportati da *trial* effettuati su un paziente sono stati più controversi, per motivi probabilmente legati agli effetti collaterali di questo farmaco (33, 34). I nostri risultati hanno evidenziato la possibilità di utilizzare una terapia combinando diversi farmaci per sfruttare gli effetti sinergici, riducendo i loro potenziali effetti collaterali. Per esempio, la metformina è un farmaco ben tollerato usato per il trattamento del diabete di tipo 2 e ha dimostrato di ridurre efficacemente l'espansione delle cisti in un modello murino di PKD (35, 36). Il nostro studio fornisce la spiegazione meccanicistica di questo risultato e suggerisce, inoltre, che l'uso di metformina o di AICAR (entrambe in grado di agire sull'attività dell'AMPK) combinate con 2DG potrebbe fornire una terapia efficace, come suggerito per il cancro (37).

In conclusione, la nostra scoperta di un interruttore metabolico della glicolisi che si osserva in assenza di una funzione normale della policistina-1 fornisce il razionale per un nuovo approccio terapeutico nella ADPKD. Vogliamo anche ipotizzare che il nostro studio potrebbe rappresentare un paradigma per cui diversi farmaci che dovrebbero funzionare in sinergia possono essere utilizzati in combinazione per sfruttare e migliorare la propria efficacia e la propria tollerabilità nel trattamento della ADPKD. Al tempo stesso, il nostro studio evidenzia la necessità di proseguire nella ricerca di base e pre-clinica prima di poter trarre ulteriori conclusioni.

## Riassunto

Il rene policistico autosomico dominante (ADPKD) è una malattia genetica molto comune, caratterizzata dalla formazione di cisti in entrambi i reni. Diverse considerazioni circa i meccanismi genetici e molecolari che stanno alla base della formazione delle cisti in questa malattia sono ancora controverse, ma c'è oggi un ampio consenso sul fatto che la ADPKD sia dovuta alla perdita di funzionalità di uno dei due geni mutati nella malattia, *PKD1* o *PKD2*. In questo breve articolo parleremo in particolare di due aspetti: 1) cercheremo di dare una panoramica sullo stato dell'arte di quanto a oggi compreso sulle basi genetiche e molecolari della malattia, cercando di fornire una visione integrata dei diversi modelli di cistogenesi proposti; 2) forniremo una descrizione dettagliata e un'ampia discussione sui recenti risultati riportati dal nostro laboratorio su un difetto a livello del metabolismo del glucosio nella ADPKD e sulle sue potenziali implicazioni terapeutiche, evidenziando anche la necessità di un'ulteriore validazione dei nostri risultati in altri modelli animali di malattia a esordio tardivo e a progressione lenta.

**Parole chiave:** Rene policistico, Glucosio, Ciglia, Cisti

**Contributi economici agli Autori:** AB: Fondazione Telethon (TCR05007).

MC: Associazione Italiana Rene Policistico (AIRP) onlus.

**Dichiarazione di conflitto di interesse:** gli autori hanno depositato un brevetto (PROVISIONARY USA) in data 3 luglio 2012 per l'utilizzo di inibitori della glicolisi nel rene policistico.

## Ringraziamenti

Gli Autori sono grati a tutti i co-Autori dello studio riportato in (7), ad altri membri del laboratorio Boletta per le numerose discussioni, alla Fondazione Telethon che finanzia AB (TCR05007) e all'Associazione Italiana Rene Policistico (AIRP) onlus che finanzia MC. Un grazie particolare alla Dr.ssa S. Bramani per il suo continuo e intelligente supporto.

*Indirizzo degli Autori:*

Dr.ssa Alessandra Boletta

Dulbecco *Telethon Institute at Dilib San Raffaele*

Via Olgettina 58

20132 Milano

boletta.alessandra@hsr.it

## Bibliografia

1. Grantham JJ, Geiser JL, Evan AP. Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1987; 31: 1145-52.
2. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2007; 369: 1287-301.
3. Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med* 2009; 60: 321-37.
4. Cornec-Le Gall E, Audrezet MP, Chen JM, et al. Type of PKD1 Mutation Influences Renal Outcome in ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 2013.
5. Rossetti S, Kubly VJ, Consugar MB, et al. Incompletely penetrant PKD1 alleles suggest a role for gene dosage in cyst initiation in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2009; 75: 848-55.
6. Vujic M, Heyer CM, Ars E, et al. Incompletely penetrant PKD1 alleles mimic the renal manifestations of ARPKD. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1097-102.
7. Rowe I, Chiaravalli M, Mannella V, et al. Defective glucose metabolism in polycystic kidney disease identifies a new therapeutic strategy. *Nat Med* 2013; 19: 488-93.
8. Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 1996; 87: 979-87.
9. Baert L. Hereditary polycystic kidney disease (adult form): a microdissection study of two cases at an early stage of the disease. *Kidney Int* 1978; 13: 519-25.
10. Watnick T, He N, Wang K, et al. Mutations of PKD1 in ADPKD2 cysts suggest a pathogenic effect of trans-heterozygous mutations. *Nat Genet* 2000; 25: 143-4.
11. Bastos AP, Piontek K, Silva AM, et al. Pkd1 haploinsufficiency increases renal damage and induces microcyst formation following ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2389-402.
12. Ahrabi AK, Terryn S, Valenti G, et al. PKD1 haploinsufficiency causes a syndrome of inappropriate antidiuresis in mice. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1740-53.
13. Calvet JP. Polycystic kidney disease: primary extracellular matrix abnormality or defective cellular differentiation? *Kidney Int* 1993; 43: 101-8.
14. Woo D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Engl J Med* 1995; 333: 18-25.
15. Mangoo-Karim R, Uchic ME, Grant M, et al. Renal epithelial fluid secretion and cyst growth: the role of cyclic AMP. *FASEB J* 1989; 3: 2629-32.
16. Torres VE, Boletta A, Chapman A, et al. Prospects for mTOR inhibitor use in patients with polycystic kidney disease and hamartomatous diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 1312-29.
17. Boletta A, Germino GG. Role of polycystins in renal tubulogenesis. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 484-92.
18. Boletta A. Emerging evidence of a link between the polycystins

- and the mTOR pathways. *Pathogenetics* 2009; 2: 6.
19. Chapin HC, Caplan MJ. The cell biology of polycystic kidney disease. *J Cell Biol* 2010; 191: 701-10.
  20. Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2508-16.
  21. Boletta A, Qian F, Onuchic LF, et al. Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell* 2000; 6: 1267-73.
  22. Merrick D, Chapin H, Baggs JE, et al. The gamma-Secretase Cleavage Product of Polycystin-1 Regulates TCF and CHOP-Mediated Transcriptional Activation through a p300-Dependent Mechanism. *Dev Cell* 2012; 22: 197-210.
  23. Fischer E, Legue E, Doyen A, et al. Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* 2006; 38: 21-3.
  24. Luyten A, Su X, Gondela S, et al. Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1521-32.
  25. Nishio S, Tian X, Gallagher AR, et al. Loss of oriented cell division does not initiate cyst formation. *J Am Soc Nephrol* 2009; 21: 295-302.
  26. Forseth RR, Schroeder FC. NMR-spectroscopic analysis of mixtures: from structure to function. *Curr Opin Chem Biol* 2011; 15: 38-47.
  27. Csibi A, Blenis J. Appetite for destruction: the inhibition of glycolysis as a therapy for tuberous sclerosis complex-related tumors. *BMC Biol* 2011; 9: 69.
  28. Yu S, Hackmann K, Gao J, et al. Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 18688-93.
  29. Raez LE, Papadopoulos K, Ricart AD, et al. A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71: 523-30.
  30. Piontek K, Menezes LF, Garcia-Gonzalez MA, Huso DL, Germino GG. A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of Pkd1. *Nat Med* 2007; 13: 1490-5.
  31. Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5466-71.
  32. Shillingford JM, Piontek KB, Germino GG, Weimbs T. Rapamycin ameliorates PKD resulting from conditional inactivation of Pkd1. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 489-97.
  33. Serra AL, Poster D, Kistler AD, et al. Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 820-9.
  34. Walz G, Budde K, Manna M, et al. Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 830-40.
  35. Takiar V, Nishio S, Seo-Mayer P, et al. Activating AMP-activated protein kinase (AMPK) slows renal cystogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 2462-7.
  36. McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. Activation of AMP-activated kinase as a strategy for managing autosomal dominant polycystic kidney disease. *Med Hypotheses* 2009; 73: 1008-10.
  37. Cheong JH, Park ES, Liang J, et al. Dual inhibition of tumor energy pathway by 2-deoxyglucose and metformin is effective against a broad spectrum of preclinical cancer models. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 2350-62.