

MeB – Pagine Elettroniche

Volume IX

Maggio 2006

numero 5

PEDIATRIA PER L'OSPEDALE

I meccanismi della proteinuria (parte prima)

Giorgio Bartolozzi

*Membro della Commissione Nazionale Vaccini***Indirizzo per corrispondenza:** bartolozzi@unifi.it

Le forme ereditarie di proteinuria comprendono un gruppo eterogeneo di malattie renali, nelle quali predominano i segni e i sintomi della disfunzione glomerulare e della proteinuria. Gli approfondimenti in questo settore hanno permesso di conoscere meglio i meccanismi della filtrazione glomerulare e le cause della proteinuria. Una volta di più gli esperimenti spontanei della natura ci permettono di conoscere i più intimi meccanismi della fisiologia.

Un articolo di revisione di tutti questi aspetti della fisiopatologia renale è comparso di recente in letteratura: Trygvason K, Patrakka J, Wartiovaara. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. N Engl J Med 2006;354:1387-401). La pubblicazione comprende 106 voci bibliografiche; gli utori lavorano al Karolinska Institute di Stoccolma e all'Istituto di Biotecnologia dell'Università di Helsinki.

Come sarà possibile rilevare dalla lettura, la funzionalità della filtrazione glomerulare è divenuta oggi quanto mai complessa; la difficoltà risiede soprattutto nell'introduzione di una nuova terminologia. La revisione verrà suddivisa in due parti.

Il decorso di questo gruppo di malattie può essere il più diverso:

- Alcuni pazienti si presentano con grave proteinuria e con il quadro della sindrome nefrosica congenita.

- Altri presentano solo una moderata proteinuria e una glomerulosclerosi focale segmentale.

Senza tener conto delle diverse cause che sono in gioco, si può dire che la malattia spesso **evolve in modo progressivo** per arrivare allo stadio terminale della malattia renale. La classificazione di queste sindromi è sempre stata difficile, perché variano sia per l'età d'inizio che per le manifestazioni cliniche, ma negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nel determinare le **cause genetiche** di queste sindromi. Per prima cosa è stato visto che le mutazioni dello stesso gene possono portare sia a una **sindrome nefrosica congenita** che a una **glomerulosclerosi focale segmentale**. Oggi tutte queste malattie vengono classificate come sindromi della proteinuria ereditaria. Da un punto di vista clinico è importante sapere che alcune sindromi da proteinuria ereditaria rispondono alla terapia, mentre altre no. Per questa ragione, le determinazioni genetiche, che sono disponibili per alcune delle sindromi ereditarie, vanno eseguite, quando questo sia possibile. Le conoscenze dei meccanismi della filtrazione glomerulare e della proteinuria sono ancora poco diffuse, ma questo campo particolare è attualmente sottoposto a ricerche intense e produttive.

LA BARRIERA DELLA FILTRAZIONE GLOMERULARE

Le cause principali delle sindromi della proteinuria ereditaria risiedono in alterazioni della barriera della filtrazione glomerulare della corteccia renale (vedi Figura IA e IB). Questa barriera ha **tre strati**:

- L'endotelio fenestrato;
- La membrana basale glomerulare;
- I podociti, insieme a un diaframma fenestrato fra i processi dei piedi dei podociti, detti comunemente pedicelli. (vedi Figura IC e ID)

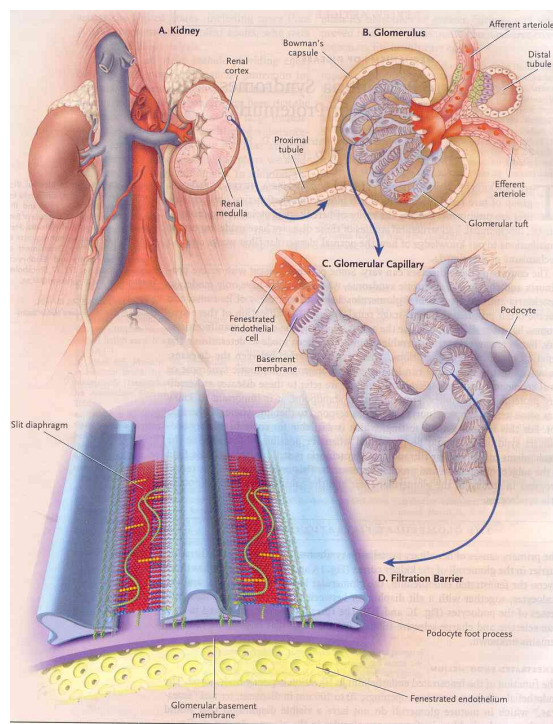


Figura 1. Filtrazione glomerulare

Ogni rene contiene circa 1 milione di glomeruli nella corteccia renale (Figura 1A). Nel riquadro B si vede un'arteriola afferente, che entra nella capsula di Bowman e si sfocia in molti capillari, che formano il gomitolo glomerulare. Le pareti dei capillari costituiscono il filtro. Il filtrato del plasma (urina primitiva) passa nel tubulo prossimale, mentre il sangue non filtrato ritorna nella circolazione generale, attraverso l'arteriola efferente (il glomerulo è una rete mirabile arteriosa). La barriera di filtrazione della parete del capillare è costituita da un endotelio fenestrato, dalla membrana basale glomerulare e dallo strato dei processi pedicelli dei podociti interdigitanti (riquadro C). Nel riquadro D, una sezione trasversale del capillare glomerulare rappresenta lo strato endoteliale fenestrato e la membrana basale glomerulare con i processi pedicelli dei sovrastanti podociti. Un diaframma ultrasottile fenestrato presenta finestre di filtrazione fra i pedicelli dei podociti, leggermente al di sopra della membrana basale.

Per mostrare il diaframma fenestrato, in questa figura i processi pedicellari dei podociti sono più piccoli.

La barriera di filtrazione si pensa sia legata alla grandezza e alla carica elettrica del filtro, ma la base molecolare della sua funzione rimane ancora sconosciuta.

ENDOTELIO FENESTRATO

La funzione dell'endotelio fenestrato nella filtrazione è poco conosciuta. Le cellule endoteliali a questo livello hanno numerose aperture di 70-100 nm di diametro, chiamate "finestre", che nel glomerulo maturo non rappresentano un diaframma che costituisca una barriera fisica per le macromolecole presenti nel plasma.

Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare, derivato dai podociti, ha un ruolo importante nello sviluppo dell'endotelio e nel mantenimento della sua fenestrazione. Le cellule dell'endotelio glomerulare hanno un glicocalice sulla loro superficie, contenente le sialoproteine e i proteoglicani a cariche negative, ma non ci sono prove che il glicocalice giochi un ruolo nella filtrazione.

MEMBRANA BASALE GLOMERULARE

La membrana basale glomerulare è una matrice acellulare con uno spessore di 300-350 nm, che fornisce un supporto strutturale alla parete dei capillari. Il suo principale componente è il collagene tipo IV, insieme ai proteoglicani, alla laminina e al nidogeno. Nel feto, le molecole del collagene tipo IV a triploelica della membrana basale glomerulare contengono catene $\alpha 1$ (IV) e $\alpha 2$ (IV) in un rapporto 2:1; questa forma di collagene è più tardi rimpiazzata da molecole tipo adulto

contenenti $\alpha 3$ (IV), $\alpha 4$ (IV) e $\alpha 5$ (IV), con un rapporto 1:1:1. La fitta rete del collagene tipo IV fornisce forza elastica alla membrana, ma probabilmente non contribuisce a selezionare le molecole per grandezza o per carica elettrica a livello del filtro glomerulare. Questo punto di vista è confermato dal reperto che mutazioni del collagene IV tipo adulto portano a distorsioni della struttura della membrana basale glomerulare in pazienti con sindrome di Alport, che presentano ematuria come manifestazione renale, ma in genere presentano solo lieve proteinuria.

Studi con il microscopio elettronico hanno identificato siti anionici nella membrana basale glomerulare. Questi siti si pensa siano localizzati sulle catene laterali di eparan solfato e condroitin solfato del perlacan e dell'agrin. Le cariche anio-

niche sembra siano importanti per la filtrazione, poiché la rimozione o la riduzione enzimatica nel numero della cariche si accompagna a proteinuria.

Le laminine sono grandi proteine eterotrimeriche, importanti per la differenziazione e per l'adesione cellulare. Esse hanno una funzione strutturale: assemblano se stesse in una rete di laminina in molti tipi di membrana basale. Nella membrana basale glomerulare del feto, una forma iso della laminina (la laminina 10) è rimpiazzata dopo la nascita dalla laminina 11. La mancanza sperimentale del gene $\beta 2$ della laminina 11, causa proteinuria e morte neonatale. Di recente è stato dimostrato che mutazioni del gene della laminina $\beta 2$, determina la sindrome di Pierson, una forma precoce e letale della sindrome nefrosica congenita. La laminina 11 è quindi indispensabile per la funzione della membrana basale glomerulare.

IL DIAFRAMMA FENESTRATO E I PODOCITI

Il diaframma fenestrato ha un ruolo importante e diretto nella filtrazione glomerulare. Alcune delle sue componenti proteiche sono interessate nel meccanismo della proteinuria. Queste proteine formano un complesso che contribuisce alla struttura del diaframma fenestrato, connette il diaframma con il citoscheletro intracellulare di actina e partecipa alla segnalazione, relativa al turnover del filtro glomerulare. La maggiore parte di queste proteine sono essenziali per la funzione del diaframma fenestrato e per la filtrazione glomerulare, poiché mutazioni o attivazioni dei rispettivi geni causa proteinuria.

Queste proteine sono rappresentate dalla nefrina, dal Neph 1 e Neph 2, dal FAT1 e FAT2, dalla podocina, dal CD2AP e da altre.

NEFRINA

La nefrina è stata la prima proteina del diaframma fenestrato a essere identificata. Il gene della nefrina è mutato nella sindrome nefrosica congenita di tipo finlandese (CNF o sindrome nefrosica tipo 1). Nel rene soltanto i podociti formano la nefrina: l'inattivazione del gene della nefrina causa una proteinuria massiva nell'animale da laboratorio, assenza di un diaframma fenestrato e la morte neonatale. La nefrina ha un corto dominio intracellulare, un dominio transmembrana e un dominio extracellulare con 8 elementi distali IgG-simili e un elemento prossimale fibronectina III-simile (vedi Figura 2A). Le molecole di nefrina interagiscono l'una con un'altra in modo omofilo. La lunghezza del dominio extracellulare è di circa 35 nm e le molecole di nefrina, originate dagli adiacenti processi podocitici, si pensa interagiscano

con la parte di mezzo della finestra per formare una struttura filtrante (vedi Figura 2B). L'importanza della fosforilazione Fyn-dipendente della nefrina (Fyn è un membro della famiglia Src della proteina tirosina chinasi) è sottolineata dal fatto che negli animali da esperimento mancanti di Fyn chinasi si manifestano proteinuria e assenza dei podociti.

NEPH1 E NEPH2

Neph1 e Neph2 sono proteine, strutturalmente in relazione con la nefrina: ognuna è formata da 5 motivi extracellulari IgG-simili (vedi Figura 2C). Esse appartengono a una famiglia di proteine transmembrana (Neph1, Neph2 e Neph3, chiamate anche filtrino) che si trovano in molti tessuti. Neph1 e Neph2 sono localizzate nel diaframma fenestrato. Quando siano fosforilate queste proteine partecipano alle segnalazioni intracellulari. Gli animali deficienti di Neph 1 hanno proteinuria e muoiono nelle prime 8 settimane di vita; il significato funzionale di Neph 2 e di Neph 3 è sconosciuto.

FAT1 E FAT2

FAT1 e FAT2 sono proteine transmembrana molto grandi del diaframma fenestrato, costituite da 34 segmenti uguali caderina-simili (vedi Figura 2E) (La caderina appartiene alla famiglia di molecole di adesione cellulare, calcio-dipendenti). La mancanza di FAT1 nel topo causa la perdita del diaframma fenestrato e proteinuria, la mancanza del cervello primitivo e difetti oculari; segue la morte in epoca perinatale. La mancanza di FAT2 causa solo proteinuria.

P-caderina e la molecola 4 di adesione giunzionale sono state identificate nel diaframma fenestrato, ma queste ultime proteine non sono indispensabili alla filtrazione glomerulare, per cui il loro ruolo deve ancora essere chiarito.

PODOCINA

Alla ricerca del gene mutato nella sindrome nefrosica congenita cortico-resistente è stata trovata la podocina, una proteina localizzata solo nella regione del diaframma fenestrato. Essa è una proteina di membrana a forma di forcina per capelli, con ambedue le estremità dirette verso lo spazio intracellulare (vedi Figura 2F). La podocina interagisce con i domini intracellulari della nefrina e del Neph1 e con la proteina associata al CD2 (CD2AP). Nei topi privi di podocina si sviluppa una grave proteinuria, per cui essi muoiono dopo pochi giorni dalla nascita.

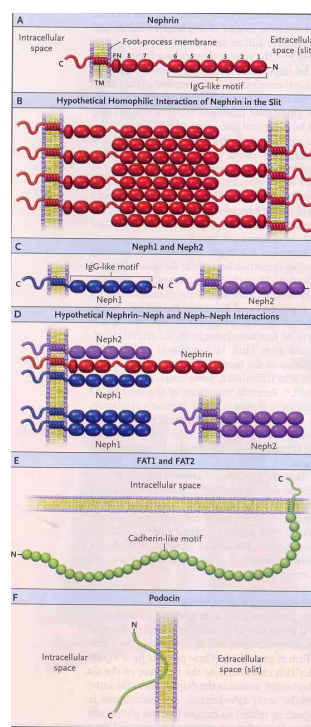


Figura 2. Componenti del complesso proteico del diaframma fenestrato nei processi dei pedicelli dei podociti.

Come si osserva nel segmento A, la nefrina ha un corto dominio intracellulare, un dominio transmembrana (TN) e un dominio N-terminale extracellulare con un elemento prossimale di fibronectina tipo III-simile e 8 elementi IgG-simili, che vengono numerati a partire dall'N terminale. Nel segmento B si osservano le interazioni omofiliche fra le molecole di nefrina. Nello spazio extracellulare, le molecole dei processi podocitici adiacenti si pensa interagiscano con il centro della finestra per formare la spina dorsale del diaframma fenestrato. Questo tipo di assemblamento può permettere ai pori di essere localizzati su ambedue i lati della parte centrale densa. Nel segmento C si osserva che ognuna delle molecole transmembrana Neph1 e Neph2 contiene 5 motivi extracellulari IgG simili. Come si vede nel segmento D, le molecole Neph si pensa abbiano interazioni omofiliche con le specole adiacenti di nefrina. Come appare nel segmento E, FAT1 e FAT2 sono proteine transmembrana di più di 500 kD, che contengono 34 consecutivi elementi extracellulari caderina-simili. Il loro modo di interagire con le altre proteine della membrana fenestrata non è stato ancora caratterizzato. Nella parte F si osserva che la podocina è una proteina integrale di membrana di circa 30 kD, con i suoi terminali N e C localizzati all'interno della cellula.

CD2AP

CD2AP è una proteina intracellulare, inizialmente caratterizzata come una proteina "adattatore" del linfocita T CD2. La maggior parte dei topi, privi di questa proteina, muoiono per una sindrome nefrosi-simile a 6-7 settimane di vita; la proteina è localizzata nella regione dei podociti del diaframma fenestrato del glomerulo. Persone che siano eterozigoti per un allele CD2AP difettoso hanno un fenotipo renale complesso: polimorfismi del gene umano si associano allo sviluppo

di una glomerulonefrite e di una glomerulosclerosi. Perciò il CD2AP può essere considerato come un gene della suscettibilità alla glomerulonefrite. Il CD2AP può interagire con i domini intracellulari della nefrina e della podocina; la proteina è stata associata anche con l'endocitosi. Il CD2AP è interessato inoltre alle segnalazioni nel diaframma fenestrato.

ALTRE PROTEINE COSTITUENTI IL DIAFRAMMA FENESTRATO

ZO-1 è una proteina intracellulare, ampiamente espressa, connessa con le giunzioni rigide epiteliali; essa è localizzata nella regione del diaframma fenestrato e può interagire con le proteine della famiglia Neph. Il ruolo della proteina ZO-1 nel complesso delle proteine del diaframma fenestrato non è conosciuto.

La scoperta di specifici componenti del complesso proteico del diaframma fenestrato ha portato a nuove conoscenze nella fisiologia della barriera di filtrazione e dei meccanismi della proteinuria. Il fatto che la maggioranza di queste proteine sia fondamentale per lo sviluppo e la funzione normale del rene, sottolinea l'importanza del diaframma fenestrato nel determinare le caratteristiche di filtrazione del glomerulo.

STRUTTURA DEL DIAFRAMMA FENESTRATO

Il diaframma fenestrato (vedi Figura 3A e 3B) ha una vera struttura di filtro poroso ?

Sulla base dei vecchi reperti alla microscopia elettronica, è stato proposto che il diaframma fenestrato sia una struttura ordinata, simile a una chiusura lampo, con pori, più piccoli come diametro delle molecole di albumina. Ma recenti analisi del diaframma fenestrato con una nuova metodica di mi-

croscopia elettronica hanno dimostrato che questo strato sottile contiene parti convolute che attraversano la linea mediana della finestra di filtrazione e spesso formano lamine con pori del diametro della molecola di albumina o più piccoli, localizzati su ambedue i lati della densità centrale (vedi Figura 3C). La microscopia immuno-elettronica e la tomografia elettronica sono state usate per evidenziare che gli elementi IgG1 e IgG2 della nefrina sono nella regione centrale del diaframma fenestrato (vedi Figura 4A, 4B e 4C). D'altra parte le molecole di nefrina immuno-marcate in soluzione (vedi Figura 4D) assomigliano a una classe di componenti del diaframma fenestrato, dimostrati con lo stesso metodo.

Tutto questo suggerisce che le proteine del diaframma fenestrato formano una struttura chiusa lampo-simile con un'ampiezza costante di 40 nm (vedi Figura 5). L'esatta loca-

lizzazione e l'interazione della Neph1, Neph", FAT1 e FAT2 con queste proteine non è ancora conosciuta. Queste proteine interagiscono all'interno della cellula con molte altre proteine che si connettono con il citoscheletro o partecipano ai segnali cellulari.

Se, come sembra, il diaframma fenestrato è un vero filtro, selettivo per grandezza, c'è da chiedersi perché esso non si ostruisca. Non c'è una chiara risposta a questa domanda, ma è possibile che le cariche negative dei glicaminoglicani, presenti nella membrana basale glomerulare e sulla superficie dei podociti, mediante un effetto di gel-esclusione o con qualche altro meccanismo non identificato fino a ora, respingano le proteine dal diaframma fenestrato in modo tale da prevenire l'ostruzione.

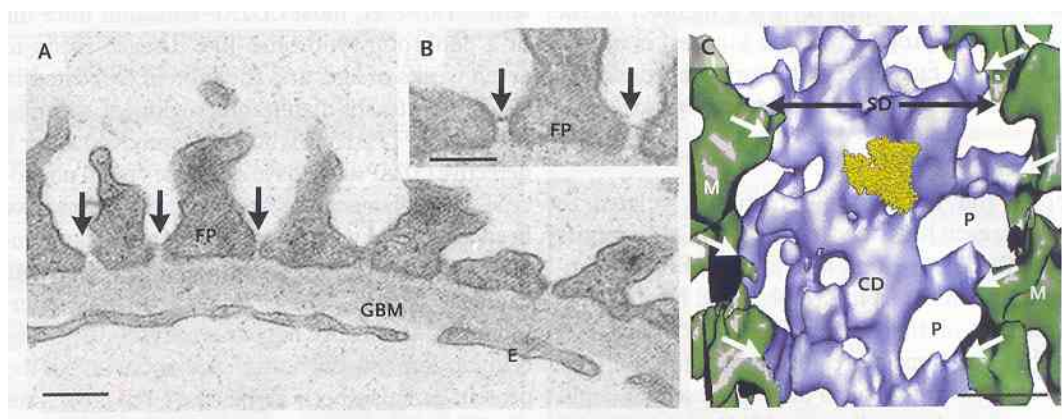


Figura 3. Immagini alla microscopia elettronica (parte A e B) e immagini elettrono-tomografiche (parte C) del diaframma podocitico fenestrato.

Nella parte A, una sezione del capillare glomerulare umano mostra le finestre di filtrazione del diaframma fenestrato (freccie) fra i processi pedicellari dei podociti (FP). Si vedono la membrana basale glomerulare (GBM) e una cellula endoteliale (E). La linea della scala è lunga 250 nm.

La parte B mostra il diaframma fenestrato (freccia) a un ingrandimento maggiore. La linea della scala è lunga 150 nm.

La parte C mostra una tomografia elettronica sottile a tre dimensioni del diaframma fenestrato di un topo (SD), visto dal davanti. Parti trasversali (freccie) si estendono dalla membrana di superficie dei podociti (M) alle parti centrali dense (CD), formando dei pori (Ps). Il tomogramma offre una ricostruzione di una superficie. Per confrontare il diametro dei pori, è stata superimposta in giallo una molecola cristallina di sieralbumina. La linea della scala è lunga 10 nm.

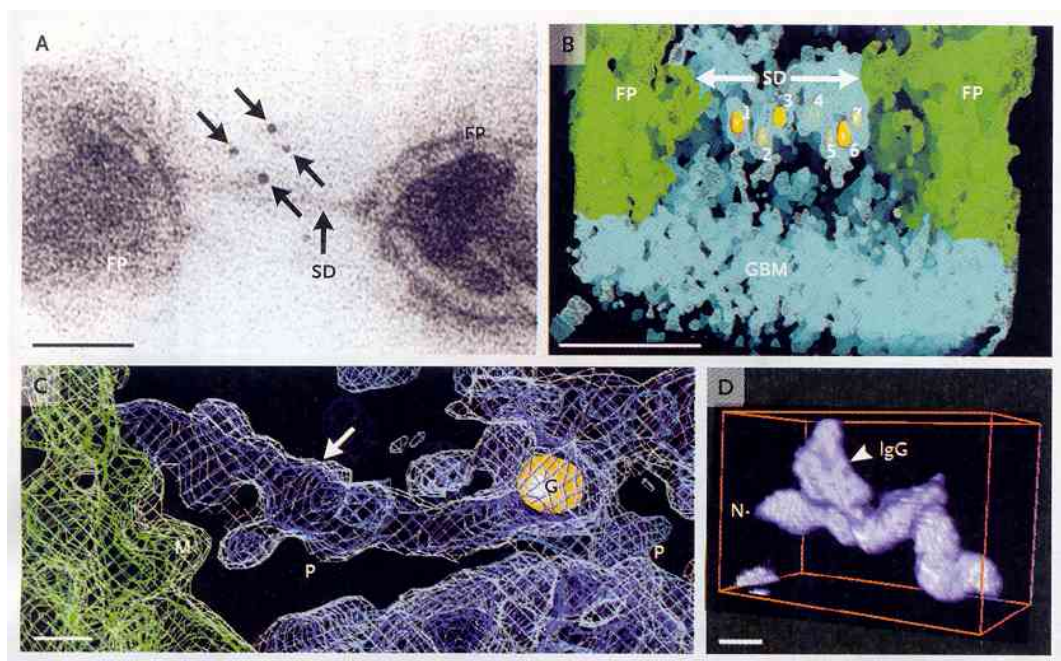


Figura 4. Immunomarcatura della nefrina nel diaframma fenestrato umano e nefrina ricombinante in soluzione.

Nella parte A è mostrata una micrografia elettronica della nefrina, marcata con oro (le frecce indicano la parte N terminale IgG 1 e 2 della nefrina) in un diaframma fenestrato, tagliato obliquamente (SD), fra due processi podocitici (FP). La linea della scala è lunga 40 nm.

Nella parte B, un tomogramma mostra una finestra di filtrazione con all'esterno la membrana basale glomerulare (GMB), i processi pedicellari e il diaframma fenestrato. I numeri da 1 a 7 indicano le parti, marcate con oro, della nefrina sotto il diaframma fenestrato. La linea della scala è lunga 40

nm.

Nella parte C si vede il primo piano di una parte trasversale (freccia) di circa 35 nm di lunghezza nel diaframma fenestrato. Sono visibili anche i pori (P). Si vede il terminale N della nefrina, marcato con oro, all'estremo distale della parte trasversale. La linea della scala è lunga 5 nm.

La parte D mostra un tipico elemento di nefrina umana ricombinante extracellulare, di circa 35 nm di lunghezza, in una soluzione contenente IgG anti-nefrina umana. La lunghezza della scala è di 5 nm.

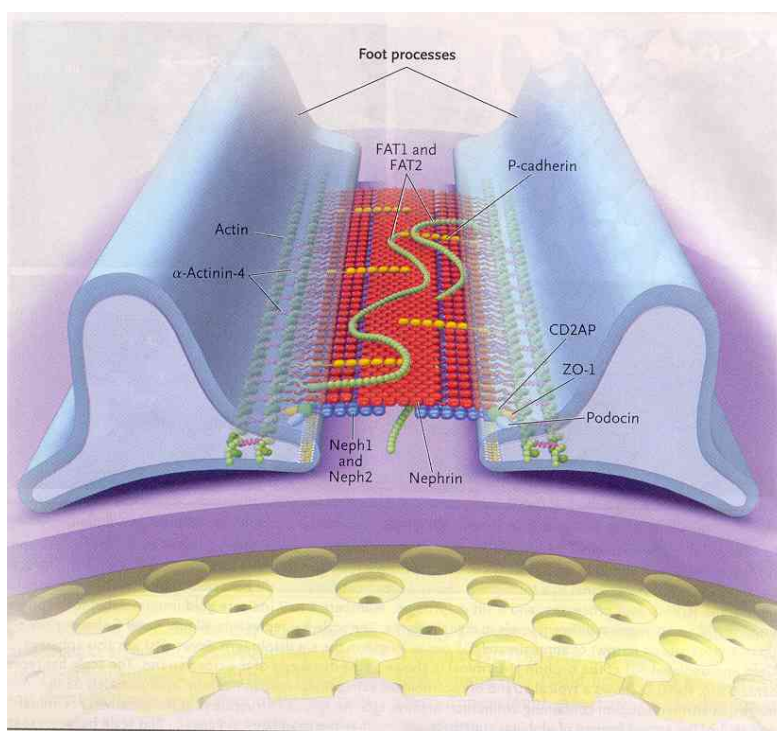


Figura 5. Componenti del complesso proteico del diaframma fenestrato che forma un filtro poroso.

Le molecole di nefrina dall'altro lato dei piedi dei dopociti interagiscono al centro della finestra, formando una densità centrale con pori da ambo i lati. La struttura cerniera-simile formata dalle molecole di nefrina probabilmente mantiene lo spessore della finestra a circa 40 nm. La nefrina interagisce anche con altre proteine nella finestra, come FAT1 e FAT2. Le molecole più corte Neph1 e Neph2 possono interagire con altre proteine, come anche con la parte prossimale delle molecole di nefrina, per stabilizzare la struttura del diaframma fenestrato. La nefrina e le molecole Neph interagiscono con la podocina intracellulare e con la proteina associata CD2. Questa presumibilmente connette il complesso delle proteine del diaframma fenestrato con ZO-1 e con gli elementi di actina. Gli elementi di actina sono uniti alle molecole di α -actina-4.