

ISTITUTO DI RICERCHE FARMACOLOGICHE «MARIO NEGRI»

FONDAZIONE PER RICERCHE ERETTA IN
ENTE MORALE CON D. P. R. 361 DEL 5
APRILE 1961 - REG. PERSONE GIUR.
PREFETTURA MILANO N. 227 CONTO
CORRENTE POST. N. 58337205
COD. FISC. E PARTITA IVA
03254210150 ANAGRAFE NAZIONALE
RICERCHE COD. G1690099

Laboratori NEGRI BERGAMO
24125 BERGAMO – Via Gavazzeni, 11
Tel. (035) 319.888 – Fax (035) 319.331

RECOGNIZED AS A TAX EXEMPT
ORGANIZATION UNDER SECTION 501 (c)
(3) OF THE UNITED STATES OF
AMERICA INTERNAL REVENUE CODE TAX
I.D. No.: 98-6000957
SISTEMA QUALITA' CERTIFICATO UNI EN
ISO 9001:2000, ATTIVITA' DI
FORMAZIONE DI NUOVI RICERCATORI IN
BIOMEDICINA

ANALISI GENETICA E TERAPIA DEI PAZIENTI CON GLOMERULOSCLEROSI FOCALE

Preparato da: Paola Bettinaglio, Paolo Cravedi,
Jessica Caprioli, Marina Noris, Giuseppe Remuzzi

Bergamo, 20 Luglio 2006

Introduzione

La glomerulosclerosi focale (GSF) è una malattia renale caratterizzata da lesioni sclerotiche segmentarie che interessano inizialmente solo alcuni glomeruli, ma che progressivamente coinvolgono l'intero parenchima renale. La prognosi della GSF associata a sindrome nefrosica è sfavorevole, con circa il 50% dei pazienti che progredisce verso la dialisi entro cinque anni dalla diagnosi. L'eziopatogenesi della malattia è ancora in larga parte sconosciuta e le terapie disponibili spesso si rivelano inefficaci. In linea generale, tuttavia, è possibile distinguere forme nelle quali è presente una componente genetica, che porta ad alterazioni nella struttura e funzione della membrana basale e del podocita, e forme cosiddette "immunologiche".

Nelle forme con componente genetica sono stati descritti difetti a carico dei geni NPHS1 (nefrina), ACTN4, NPHS2 (podocina), CD2AP, WT1 e TRPC6, che codificano per proteine importanti per la funzionalità della barriera di filtrazione glomerulare. Le casistiche più ampie riportano che circa il 45-55% delle forme familiari recessive e l'8-20% dei pazienti con forme sporadiche ha mutazioni nel gene che codifica per la Podocina (NPHS2). Inoltre una piccola percentuale di pazienti con forma sporadica è portatore di una mutazione nel gene che codifica per la Nefrina (NPHS1).

Mutazioni negli altri geni sono state riportate in letteratura in casi isolati.

Poiché questi pazienti hanno un'alterazione primitiva a carico del podocita, la terapia steroidea, di prima scelta per la cura dei pazienti con GSF, nella maggior parte dei casi risulta inefficace, e circa il 50% progredisce inesorabilmente verso l'insufficienza renale terminale. Il trapianto renale rimane al momento l'unica possibile alternativa alla dialisi per questi pazienti. In queste forme la ricorrenza della malattia sul rene trapiantato è molto rara (0.02%) se confrontata con quella osservata nella totalità dei casi di GSF (30%).

E' stato visto in ratti di ceppo Imai, geneticamente predisposti a sviluppare glomerulosclerosi focale, che è possibile ridurre la proteinuria e l'iperlipidemia con farmaci che agiscono bloccando il sistema renina-angiotensina. Inoltre, uno studio retrospettivo in pazienti con diagnosi di GSF, ha dimostrato l'efficacia degli Ace inibitori nel ridurre significativamente la proteinuria. Quindi, il trattamento con questi farmaci potrebbe essere efficace nel ridurre la progressione del danno renale in pazienti con GSF su base genetica.

Nel corso degli ultimi anni sono emerse evidenze che supportano il ruolo del sistema immune nelle forme in cui non è identificabile un'alterazione primitiva a carico del podocita. E' noto infatti che la GSF è associata alla presenza di atopia, malattie linfoproliferative, e alterazioni a carico

dell'immunità Th2. Recentemente è stato identificato un nuovo possibile meccanismo patogenetico della GSF. In soggetti affetti dalla malattia, è stata descritta un'aumentata espressione del CD80 a livello podocitario. Questa molecola funge da segnale di costimolazione per attivare i linfociti T e la risposta immunitaria in sede renale. Questa scoperta fornisce un importante legame tra la malattia e il sistema immune, a sua volta responsabile del danno a livello renale.

Inoltre, alcuni Autori hanno ipotizzato l'esistenza di un fattore circolante che farebbe aumentare la permeabilità della barriera di filtrazione glomerulare, detto fattore permeabilizzante (FP), prodotto proprio da linfociti T e che potrebbe avere un effetto tossico diretto sui podociti. L'esistenza di questo fattore è supportata dall'elevata ricorrenza della malattia che si osserva a pochi giorni dal trapianto nelle forme in cui non si individuano mutazioni in geni noti e dall'osservazione che la plasmateresi può ridurre la proteinuria in molti casi di ricorrenza della malattia. Questo fattore, tuttavia, non è ancora stato identificato. Inoltre, dati contrari all'esistenza del FP sono apparsi recentemente in letteratura, dimostrando che l'attività del FP non correla con variazioni della proteinuria in pazienti con GSF e l'attività del FP rimane invariata dopo somministrazione di ciclosporina. Attualmente si ipotizza che sia piuttosto la mancanza di qualche fattore, importante per l'integrità strutturale e funzionale del podocita, ad essere responsabile dell'aumento di permeabilità della barriera di filtrazione glomerulare.

Gli steroidi rappresentano ancora oggi la terapia di prima linea per le forme non genetiche di GSF, con una risposta che varia sensibilmente a seconda della durata del trattamento e delle dosi impiegate. Circa un terzo dei pazienti, tuttavia, risulta resistente agli steroidi o presenta ricorrenza della malattia al momento in cui la terapia viene interrotta. Uno studio su 49 pazienti con GSF steroideo-resistente, randomizzati al trattamento con prednisone associato a placebo o ciclosporina, ha dimostrato che la ciclosporina è in grado di indurre remissione della nefropatia nel 70% di questi pazienti. A due anni dall'interruzione della terapia con ciclosporina, tuttavia, il 60% dei pazienti ha una ripresa della malattia. L'impiego di agenti citotossici come la ciclofosfamida, clorambucil, o azatioprina ha dato risultati ancora meno incoraggianti.

Recentemente è stato pubblicato il caso di un bambino che ha sviluppato una recidiva della GSF dopo trapianto renale in cui il trattamento con Rituximab (anticorpo diretto contro l'antigene CD20 dei linfociti B), somministrato per curare un linfoma secondario ad infezione da virus Epstein Barr, insorto dopo la ricomparsa della sindrome nefrosica, ha determinato una completa remissione della proteinuria. Questo caso ha suggerito l'esistenza di un possibile ruolo dei linfociti B, bersaglio della terapia con Rituximab, nella patogenesi della malattia. Non esiste tuttavia al momento un razionale forte che supporti l'impiego di questa terapia per il trattamento della GSF.

Nel corso degli ultimi anni si è reso disponibile un anticorpo anti CD52, il Campath-1H, in grado di eliminare i linfociti T per più di sei mesi. In considerazione dell'alterazione nell'attività dei Th2 riscontrata in pazienti con GSF, potrebbe essere ragionevole il trattamento con questo anticorpo. Tuttavia in letteratura è stato riportato il caso di un ragazzo sottoposto a trapianto renale in cui la terapia con Campath-1H non è stata in grado di prevenire la ricorrenza della malattia. Inoltre la delezione linfocitaria indotta da questo anticorpo potrebbe esporre i pazienti ad un rischio di infezioni opportunistiche sproporzionato rispetto alla malattia che si intende trattare.

Un altro approccio potenzialmente applicabile per la cura delle forme di GSF "immunologiche" potrebbe essere quello di bloccare i segnali di costimolazione CD80 espressi in modo anomalo sul podocita, così da impedire l'attivazione dei linfociti T. A tal fine si potrebbero usare composti come il Belatacept, già utilizzati per la prevenzione del rigetto acuto nel trapianto renale e per la cura dell'artrite reumatoide, ma questi farmaci non sono ancora disponibili sul mercato e il loro profilo di sicurezza non è ancora stato del tutto definito, a causa del limitato numero di pazienti trattati fino ad ora.

Obiettivi dello studio

Ad oggi la mancanza di una chiara conoscenza dei meccanismi patogenetici della malattia non ha permesso di individuare una strategia terapeutica mirata ed efficace per il trattamento della GSF. Il presente studio è stato disegnato con l'obiettivo di migliorare i criteri diagnostici delle varie forme di GSF, ampliando le nostre conoscenze sulle cause genetiche della malattia. Questo ci permetterà di applicare terapie volte a rallentare la progressione della malattia che siano specifiche ed efficaci per le differenti forme di GSF.

Disegno sperimentale

Tutti i pazienti con GSF arruolati nello studio verranno trattati inizialmente con terapia steroidea (attualmente la nostra casistica è di 20 pazienti con forma sporadica e 5 con forma familiare). Di questi, quelli che non rispondono alla terapia con gli steroidi verranno tipizzati per i difetti nei geni noti (NPHS1, ACTN4, NPHS2, CD2AP, WT1 e TRPC6), con i metodi del DHPLC e sequenziamento diretto. I pazienti con mutazioni a carico di questi geni, entreranno nel protocollo della Remission Clinic, una strategia che comprende norme dietetiche, stili di vita e terapia con ACE inibitori, sartanici e statine, volta a ridurre e rallentare la progressione della nefropatia. Questa strategia terapeutica, già in atto da oltre 7 anni nel nostro Centro, si è dimostrata efficace nel ridurre la progressione del danno renale in tutte le forme di nefropatia.

Ci aspettiamo però che più del 50% dei nostri pazienti non presenti alcuna mutazione in tali geni. Questi pazienti verranno trattati con una terapia innovativa che agisce sulla componente immunologica e che prevede la somministrazione di timoglobuline di coniglio (RATG), anticorpi policlonali anti timociti umani rivolti contro i linfociti T, B e il CD80. La logica nell'impiego delle RATG è data dal fatto che contengono anticorpi che vanno potenzialmente a bloccare tutti i possibili meccanismi immunologici responsabili della GSF fino ad ora descritti. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che l'impiego di RATG riduce significativamente il rischio di ricorrenza della GSF dopo trapianto rispetto al Campath-1H e ad altri anticorpi monoclonali. La risposta al trattamento si valuterà mediante misurazione periodica della proteinuria e dei parametri di funzionalità renale. Prima e a vari tempi dopo il trattamento con RATG, si valuteranno inoltre la frequenza e il fenotipo delle sottopopolazioni leucocitarie del sangue (linfociti B e T, monociti, cellule natural killer e granulociti). In particolare, nei linfociti T, si studierà l'espressione, con citofluorimetria a flusso e PCR quantitativa, di markers specifici di attivazione (citochine infiammatorie, segnali di costimolazione) e di regolazione (FOXP3, CTLA4, IDO, CD25).

Poiché non è possibile escludere una componente genetica della malattia in queste forme "immunologiche", in questo gruppo di pazienti cercheremo le eventuali alterazioni in nuovi geni, mediante lo studio di geni candidati, selezionati utilizzando i seguenti criteri: geni che codificano per proteine coinvolte nella regolazione del sistema immune; geni che potrebbero avere un ruolo nel mantenimento della morfologia e della fisiologia del podocita; geni che se deleti o mutati producono la malattia in modelli animali già descritti in letteratura. L'analisi di linkage ed il sequenziamento diretto saranno i metodi di studio utilizzati.

Sulla base di questi criteri analizzeremo:

- Citochine

Le citochine sono polipeptidi rilasciati in condizioni di attivazione da diversi tipi di cellule leucocitarie, in particolare i linfociti T; ne sono state descritte più di venti, alcune delle quali hanno un ruolo di stimolo della risposta immune (interferon gamma, interleuchina 2, tumor necrosis factor alfa, interleuchina 12). Una produzione eccessiva di queste citochine è stata associata al rigetto del trapianto e alle malattie autoimmuni. Altre molecole di questa categoria (interleuchina 10 e interleuchina 4), d'altro canto, hanno un ruolo nel regolare la risposta immune e nello "spegnere" l'attività dei linfociti.

- Segnali di costimolazione

Si tratta di molecole espresse sulla superficie dei linfociti T, B, dei monociti e delle cellule dendritiche. Alcune di queste, come CD80 e CD86, sono espresse in condizioni patologiche nei podociti e nelle altre cellule del rene, e possono avere un ruolo nello stimolare la risposta infiammatoria dei linfociti e nell'indurre il danno renale.

- Markers di immunoregolazione

Accanto ai linfociti T effettori, responsabili della risposta immune, sono state descritte sottopopolazioni di linfociti T che sono specializzati nel regolare e spegnere tale risposta. Queste cellule sono caratterizzate dall'espressione di molecole intracellulari (FOXP3, IDO) e superficiali (CTLA4, CD25) che sono indispensabili per l'attività regolatoria. Topi knock-out (KO) per FOXP3, ad esempio, sviluppano una malattia poliautoimmune letale e lo stesso si osserva in pazienti con mutazioni in questo gene.

- Integrine

Le integrine sono una famiglia di molecole eterodimeriche che mediano l'aderenza dei podociti alla membrana basale glomerulare e alla matrice extracellulare. Alterazioni nell'espressione del gene ITGA3, che codifica per la subunità $\alpha 3$, è stata osservata in pazienti con nefropatia membranosa, suggerendo l'importanza delle integrine nel mantenimento della struttura e funzionalità renale. Kreidberg JA e colleghi hanno mostrato che topi KO per il gene $\alpha 3$ presentano anomalie renali tipiche della GSF.

- *ZO-1:*

ZO-1 è una proteina di membrana che nel podocita gioca un ruolo importante in quanto lega i filamenti periferici di actina al complesso P-caderine/catenine. Una distribuzione anomala di ZO-1 è stata osservata in associazione con proteinuria in ratti con glomerulopatia spontanea.

- *Il complesso caderine/catenine*

Le caderine sono molecole di adesione che promuovono l'interazione fra cellule e si legano al citoscheletro attraverso le catenine. Molti studi hanno correlato variazioni nell'espressione delle caderine con processi come la migrazione, la proliferazione, l'apoptosi e la differenziazione cellulare. Questi processi sono potenzialmente coinvolti nella patogenesi delle glomerulonefriti.

- *Il complesso ILK-parvin:*

Il complesso ILK- parvin è importante per l'integrità e funzione del podocita in quanto fa da ponte fra il citoscheletro di actina e la membrana basale glomerulare, la sua distruzione induce infatti la deposizione di matrice, una diminuita proliferazione cellulare ed apoptosi. La delezione nel podocita del gene ILK in modelli murini provoca una grave alterazione della membrana basale glomerulare, albuminuria e glomerulosclerosi.

- *Nck1 e 2:*

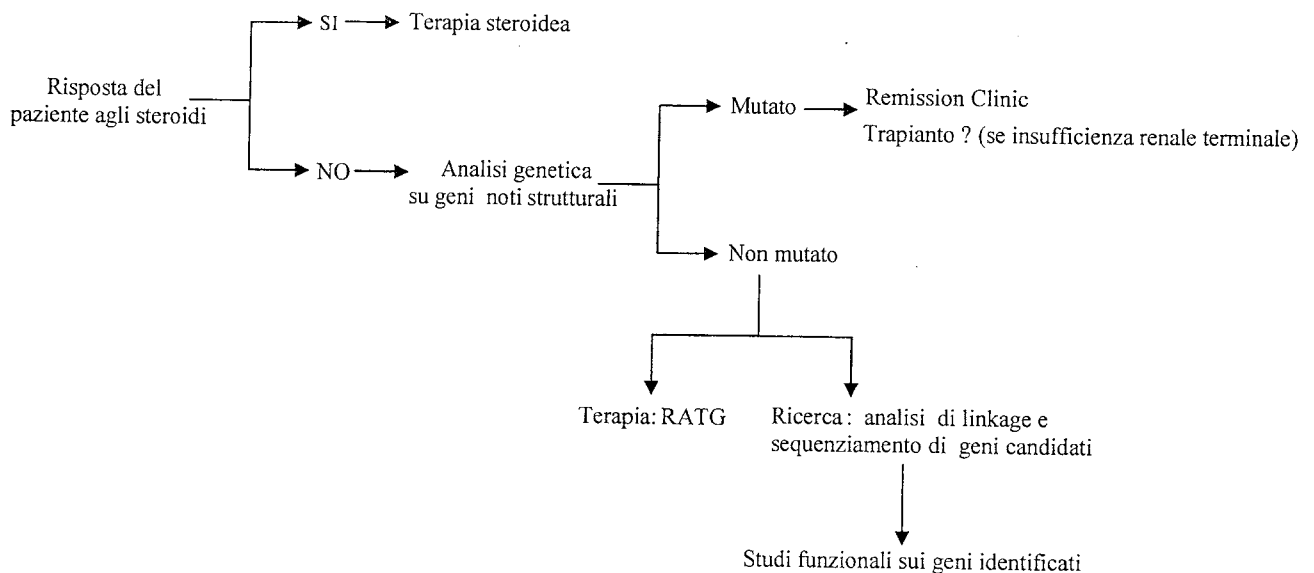
In tutti i mammiferi le proteine Nck1 e 2 mediano la "comunicazione" fra recettori presenti sulla membrana delle cellule ed il citoscheletro di actina. Un recente lavoro ha dimostrato che le proteine Nck1 e 2 sono entrambe espresse nei podociti, dove legano la nefrina, e topi KO per il gene Nck1 con delezione nei podociti del gene Nck2, sviluppano albuminuria e glomerulosclerosi focale.

Una volta individuati nuovi geni correlati alla malattia, ne potremo verificare l'importanza funzionale in modelli animali difettivi per questi geni (topi KO) e studiare le caratteristiche morfologiche e funzionali dei podociti in questi animali.

Il modello animale servirà anche per studi di terapia genica e cellulare:

- 1) Si cercherà di caratterizzare il modello animale KO.
- 2) Si cercherà di ottenere cellule staminali ematopoietiche dal midollo osseo e si valuterà la capacità di tali cellule di colonizzare il rene e di differenziarsi in cellule mature.
- 3) In queste cellule si procederà a correggere il gene difettivo tramite approcci di terapia genica che prevede l'uso di vari tipi di vettori contenenti il gene normale.
- 4) Le cellule trasfettate stabilmente verranno selezionate, espanse e infuse in topi KO.
- 5) Si valuterà se tali cellule sono in grado di correggere il difetto alla base della GSF.

Il seguente schema riassume il disegno sperimentale dello studio:



Bibliografia essenziale:

- Antignac C , JCI 2002; 109:447-449. *Genetic models: clues for understanding the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome.*
- Boute N et al, nature 2000 ; 24:349-354. *NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome.*
- Kaplan JM et al, Nature 2001; 24:251-256. *Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis.*
- Kim JM et al., Science 2003 ; 300 :1298-1300. *CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility.*
- Winn MP et al., Nat Gen 2005; 37(7) :739-744. *A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis.*
- Conlon PJ et al., Kidney Int 1999; 56: 1863-1871. *Spectrum of disease in familial focal segmental glomerulosclerosis.*
- Rodriguez-Iturbe B et al., Kidney Int 2004; 66 (2): 668-75. *AT-1 receptor blockade prevents proteinuria, renal failure, hyperlipidemia, and glomerulosclerosis in the Imai rat.*
- Stiles KP et al, Clin Nephrol. 2001; 56(2)89-95. *Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and steroid therapy on proteinuria in FSGS: a retrospective study in a single clinic.*
- Cattran D et al., JASN 2003; 14:448-453. *Serial estimates of serum permeability activity and clinical correlates in patients with native kidney focal segmental glomerulosclerosis.*
- Carraro M et al., JASN 2003; 18:689-693. *Nephrotic urine prevents increased rat glomerular albumin permeability induced by serum from the same patient with idiopathic nephrotic syndrome.*
- Vincenti F et al., N Engl J Med. 2005 ; 353(8):770-81. *Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation.*
- Wu C et al., Biochim Biophys Acta 2004 ; 1695 :55-62. *The PINCH-ILK-parvin complexes: assembly, functions and regulation.*
- El-Aouni C et al. JASN 2006; 17(5):1334-44. *Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis.*
- Jones N e al., Nature 2006; 440(7085):818-23. *Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes.*