

SEGNALI SIMIL-SINAPTICI ALLA BARRIERA DI FILTRAZIONE: IL RUOLO DI NEFRINA

Min Li, Silvia Armelloni, Laura Giardino, Alessandro Corbelli, Deborah Mattinzoli, Anna Mondini, Masami Ikehata, Piergiorgio Messa, Maria Pia Rastaldi

Laboratorio di Ricerca Nefrologica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico & Fondazione D'Amico per la Ricerca sulle Malattie Renali, Milano

Il glomerulo renale filtra tutto il sangue circolante ogni 5 minuti, tutti i giorni e per tutta la vita. Questa importante funzione è svolta dalle cellule che compongono la barriera di filtrazione glomerulare, cioè dai podociti e dalle cellule endoteliali glomerulari, le quali pertanto sono costantemente esposte a un microambiente altamente variabile, nel quale devono essere in grado di discriminare tra variazioni fisiologiche e patologiche. A tal fine, le cellule della barriera di filtrazione necessitano di comunicare tra loro in modo estremamente efficiente, rapido e altamente informativo.

Nonostante negli ultimi anni siano stati fatti progressi rilevanti nella comprensione delle caratteristiche fisiologiche e dei meccanismi patologici che regolano la barriera di filtrazione glomerulare, questi aspetti di *signaling* intercellulare rimangono perlopiù oscuri a causa della struttura complessa e convoluta del glomerulo renale e della sua localizzazione profonda nell'organismo. Inoltre, il grado elevato di differenziazione delle cellule della barriera rende difficile il loro ottenimento e mantenimento in coltura primaria. Ne consegue che, a tutt'oggi, le proprietà dell'endotelio glomerulare sono ancora perlopiù sconosciute, e la maggior parte dei lavori sperimentali focalizzati sull'indagine sulle cellule podocitarie viene condotta su linee cellulari immortalizzate.

Il nostro gruppo lavora da una decina di anni a una linea di ricerca che ha messo in evidenza le numerose similarità morfologiche e molecolari esistenti tra podociti e cellule neuronali. Questi tipi di cellule sono entrambi, infatti, altamente differenziati e altamente ramificati, presentano un assetto citoscheletrico comune (1) ed esprimono una serie di proteine a espressione ristretta a pochi tipi cellulari, come, per esempio, nefrina (2), Neph1 e Neph2 (3), *glomerular epithelial protein 1* (GLEPP1) (4), sinaptopodina (5), drebrin (6), i trasportatori di aminoacidi CAT3 e EAAT2 (7) e la proteina processatrice dell'RNA *Sam68-like mammalian protein 2* (8).

In questo ambito, partendo dalla descrizione della presenza nel podocita della GTPasi sinaptica Rab3A (9), abbiamo scoperto che tale cellula condivide con le cellule neuronali una serie di meccanismi di segnale. I nostri dati hanno, infatti, dimostrato che i podociti possiedono un sistema completo di comunicazione neurono-simile, costituito da vescicole simil-sinaptiche funzionali (in grado, cioè, di compiere cicli di esocitosi-endocitosi spontanea e regolata), contenenti neurotrasmettitori (per esempio, glutammato e GABA), e dai corrispondenti recettori specifici (10).

Questi dati largamente innovativi, supportati dai risultati di altri gruppi (11, 12) stanno cambiando l'approccio alla cellula podocitaria e al suo ruolo nella barriera di filtrazione, intro-

ducendo un concetto importante: i podociti, grazie alla loro localizzazione e alla loro struttura ramificata, sono in grado di orchestrare modalità efficienti di comunicazione con risvolti funzionali sull'efficienza del filtro glomerulare. Infatti, alterazioni di questi sistemi di *signaling*, sia sul fronte vescicolare che su quello recettoriale, sono causa di danno podocitario e proteinuria (13, 14).

Ma in che modo e con quali meccanismi molecolari il *signaling* simil-sinaptico influenza la struttura del podocita e la funzione del filtro glomerulare?

Per rispondere a questa domanda abbiamo svolto un'indagine in parallelo su cellule neuronali e podocitarie, investigando i rapporti tra nefrina e molecole di segnale neuronale (15).

Siamo partiti dall'osservazione che nefrina è espressa anche a livello neuronale e abbiamo osservato che nei neuroni, come era stato dimostrato nei podociti, nefrina è concentrata in frazioni insolubili della membrana citoplasmatica, dove interagisce con la tirosin-kinasi Fyn.

Nei neuroni, molecole della famiglia *Ig-like*, alla quale appartiene nefrina, sono proteine di adesione sinaptica, con funzioni innanzitutto strutturali importanti per il mantenimento dei corretti rapporti spaziali tra versante pre- e post-sinaptico (16). Le molecole di adesione sinaptica sono, inoltre, cruciali nel facilitare l'organizzazione della sinapsi stessa, dove reclutano e organizzano i componenti della sinapsi, come le vescicole pre-sinaptiche e i recettori di neurotrasmettitori.

Con il nostro studio abbiamo dimostrato che nefrina effettivamente si comporta da molecola di adesione sinaptica, dato che interagisce con i recettori ionotropici e metabotropici del glutammato NMDAR e Grm1 e con la molecola *scaffold* PSD95. La cosa più interessante è che questo assetto molecolare è presente non solo nei neuroni, ma anche nei podociti (Fig 1).

Anche la presenza della kinasi Fyn rientra in questo schema; infatti nei neuroni la fosforilazione Fyn-mediata del recettore glutammatergico NMDA facilita l'interazione dello stesso con PSD95. Tale fosforilazione Fyn-mediata di NMDAR aumenta in seguito all'induzione della cosiddetta "*long term potentiation*", un meccanismo di potenziamento del segnale che sottende ai fenomeni di plasticità sinaptica implicati nei meccanismi della memoria (17).

PSD95 è una molecola "ponte" che, nei neuroni, è coinvolta nell'assemblaggio e nell'organizzazione dei complessi di segnale nella "densità post-sinaptica", cioè nella zona della sinapsi che si trova immediatamente di fronte alla membrana pre-sinaptica e chiamata così per il suo aspetto "denso" alla microscopia elettronica. PSD95 appartiene alla famiglia

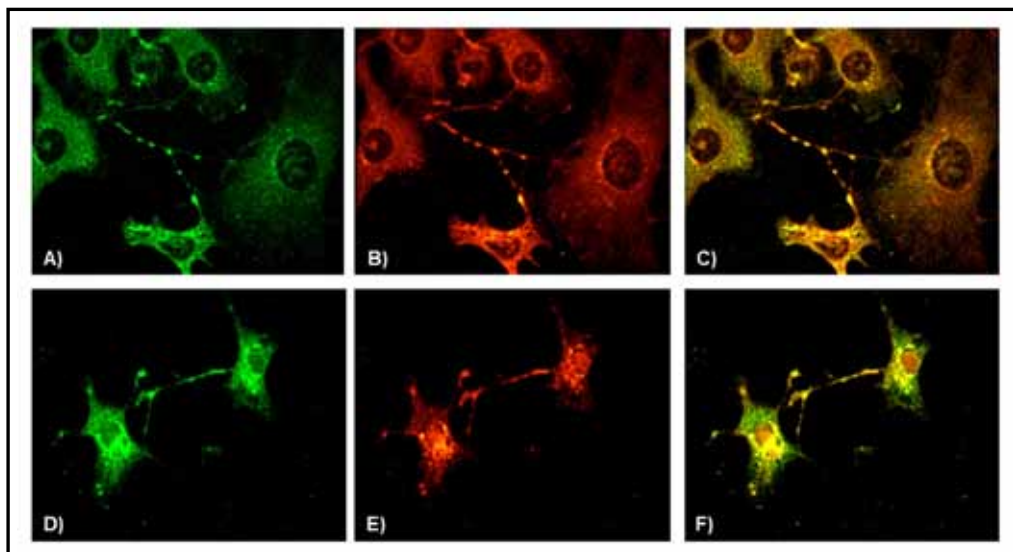


Fig. 1 - La doppia immuno-colorazione di podociti in coltura con anticorpi diretti contro nefrina (a, d), il recettore NMDA del glutammato (b) e PSD95 (e) mostra la colocalizzazione di queste molecole (c, f), soprattutto a livello dei prolungamenti cellulari (immuno fluorescenza indiretta, A-C: 630X; D-F: 400X).

MAGUK (*membrane-associated guanylate-kinase*) e contiene 3 domini PDZ consecutivi, importanti per il *clustering* dei canali ionici e delle molecole di adesione sinaptica (18, 19).

Nel sistema nervoso centrale, il materiale elettrondenso che riempie lo spazio tra le due membrane sinaptiche è costituito da componenti della matrice extracellulare insieme ai domini extracellulari delle molecole di adesione che interagiscono in modo omofilico o eterofilico (18). È evidente come questa descrizione corrisponda esattamente allo *slit diaphragm* glomerulare, dove i domini extracellulari di nefrina, Neph1-3, e caderine interagiscono allo stesso modo (20).

Negli ultimi anni, oltre al nostro gruppo, altri Autori hanno sottolineato le somiglianze molecolari e funzionali tra lo *slit diaphragm* glomerulare e la giunzione sinaptica neuronale (21). Lavori recenti hanno, inoltre, documentato l'espressione podocitaria delle molecole di adesione sinaptica *Ephrin B1* (22) e *neurexin 1* (23). Inoltre, è stato recentemente descritto che la molecola podocitaria *podocalyxin* è anche un'importante molecola di adesione sinaptica nei neuroni (24).

Pertanto, possiamo affermare che i nostri risultati, mostrando la connessione di nefrina con i recettori del glutammato e con molecole chiave come PSD95 e la kinasi Fyn sia nei neuroni che nei podociti, oltre a sottolineare ulteriori similitudini molecolari tra questi due tipi cellulari, permettono di iniziare a

individuare relazioni funzionali tra il *signaling* simil-sinaptico e molecole cruciali per lo stato di salute del podocita, come nefrina.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI: Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

CONTRIBUTI ECONOMICI AGLI AUTORI: Gli Autori dichiarano di non aver ricevuto contributi economici per lo svolgimento dello studio.

CONSENSO INFORMATO: Gli esperimenti sugli animali sono stati condotti nel rispetto delle norme vigenti.

Indirizzo degli Autori:

Dr.ssa Maria Pia Rastaldi
Laboratorio di Ricerca Nefrologica
Fondazione IRCCS Ca' Granda
Ospedale Maggiore Policlinico
Via Pace 9
20122 Milano
e-mail: mariapia.rastaldi@policlinico.mi.it

BIBLIOGRAFIA

1. Kobayashi N, Gao SY, Chen J, et al. Process formation of the renal glomerular podocyte: is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons? *Anat Sci Int* 2004; 79 (1): 1-10.
2. Putaala H, Soininen R, Kilpeläinen P, Wartiovaara J, Tryggvason K. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 2001; 10 (1): 1-8.
3. Gerke P, Benzing T, Höhne M, et al. Neuronal expression and interaction with the synaptic protein CASK suggest a role for Neph1 and Neph2 in synaptogenesis. *J Comp Neurol* 2006; 498 (4): 466-75.
4. Beltran PJ, Bixby JL, Masters BA. Expression of PTPRO during mouse development suggests involvement in axonogenesis and differentiation of NT-3 and NGF-dependent neurons. *J Comp Neurol* 2003; 456 (4): 384-95.

5. Gloy J, Reitinger S, Fischer KG, et al. Amino acid transport in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278 (6): F999-F1005.
6. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Krüger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 1997; 139 (1): 193-204.
7. Peitsch WK, Hofmann I, Endlich N, et al. Cell biological and biochemical characterization of drebrin complexes in mesangial cells and podocytes of renal glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (6): 1452-63.
8. Cohen CD, Doran PP, Blattner SM, et al. Sam68-like mammalian protein 2, identified by digital differential display as expressed by podocytes, is induced in proteinuria and involved in splice site selection of vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 (7): 1958-65.
9. Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, et al. Glomerular podocytes possess the synaptic vesicle molecule Rab3A and its specific effector rabphilin-3a. *Am J Pathol* 2003; 163: 889-99.
10. Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, et al. Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB J* 2006; 20: 976-8.
11. Miyauchi N, Saito A, Karasawa T, et al. Synaptic vesicle protein 2B is expressed in podocyte, and its expression is altered in proteinuric glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17 (10): 2748-59.
12. Anderson M, Suh JM, Kim EY, Dryer SE. Functional NMDA receptors with atypical properties are expressed in podocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300 (1): C22-32.
13. Giardino L, Armelloni S, Corbelli A, et al. Podocyte glutamatergic signaling contributes to the function of the glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20 (9): 1929-40.
14. Puliti A, Rossi PI, Caridi G, et al. Albuminuria and glomerular damage in mice lacking the metabotropic glutamate receptor 1. *Am J Pathol* 2011; 178 (3): 1257-69.
15. Li M, Armelloni S, Ikehata M, et al. Nephrenin expression in adult rodent central nervous system and its interaction with glutamate receptors. *J Pathol* 2011. DOI:10.1002/path.2923. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21630272.
16. Yamagata M, Sanes JR, Weiner JA. Synaptic adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 621-32.
17. Isosaka T, Hattori K, Kida S, et al. Activation of Fyn tyrosine kinase in the mouse dorsal hippocampus is essential for contextual fear conditioning. *Eur J Neurosci* 2008; 28: 973-81.
18. Han K, Kim E. Synaptic adhesion molecules and PSD-95. *Prog Neurobiol* 2008; 84: 263-83.
19. Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, et al. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 1995; 269: 1737-40.
20. Holthöfer H. Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2124-8.
21. Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, et al. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 428-37.
22. Hashimoto T, Karasawa T, Saito A, et al. Ephrin-B1 localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocyte. *Kidney Int* 2007; 72: 954-64.
23. Saito A, Miyauchi N, Hashimoto T, et al. Neurexin 1, a presynaptic adhesion molecule, localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocytes in kidneys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; DOI: 10.1152/ajpregu.00640.2009.
24. Vitureira N, Andrés R, Pérez-Martínez E, et al. Podocalyxin is a novel polysialylated neural adhesion protein with multiple roles in neural development and synapse formation. *PLoS One* 2010; 5: e12003