

Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones*

Documento preparato da Maria Stella Graziani, Giampaolo Merlini, Concetta Petrini

Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare Clinica
Divisione Scientifica - Gruppo di Studio Proteine

LA PROTEINA DI BENICE JONES (BJ)

La proteina di BJ è costituita da CATENE LEGGERE LIBERE MONOCLONALI, cioè secrete da cellule B derivate da un unico progenitore (clone) (1,2).

Nelle discrasie della linea cellulare B può essere accentuato lo sbilanciamento, già presente fisiologicamente, fra sintesi di catene pesanti e catene leggere, fino a superare la capacità di riassorbimento e metabolizzazione renale. Ne consegue la comparsa di proteina di BJ nelle urine. La proteina di BJ può essere rappresentata da catene leggere libere monoclonali intatte, da catene incomplete o frammenti, o da polimeri; da ciò deriva il rilievo di forme molecolari diverse con masse molecolari variabili.

INDICAZIONI (3)

- Soggetti con componente monoclonale sierica: al riscontro e ad ogni successivo controllo
- Sospetto clinico o laboratoristico (es ipogammaglobulinemie non attese in soggetti adulti) di mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldenström, amiloidosi AL, malattia da deposizione di catene leggere e altre condizioni correlate.

PATOLOGIE ASSOCIATE A PROTEINA DI BJ

La proteinuria di BJ può manifestarsi in diverse situazioni patologiche, le più frequenti sono

- mieloma multiplo
- macroglobulinemia di Waldenström
- amiloidosi da catene leggere immunoglobuliniche monoclonali (AL)
- malattia da deposizione di catene leggere.

Si ricorda che queste condizioni sono rare. La loro incidenza nei paesi occidentali varia da circa 4/100.000 per anno per il mieloma multiplo a 0.9/100.000 per anno per l'amiloidosi AL. Ancora meno frequente è la presenza di proteinuria di BJ nei linfomi e nelle leucemie linfatiche croniche. Raramente si manifesta in associazione con neoplasie non linfoproliferative. E' stata inoltre descritta una proteinuria di BJ idiopatica (o benigna, o di incerto significato).

RICERCA

Campione

La proteina di BJ è facilmente degradata dalla flora batterica presente in vescica, per

*Questo è un documento preliminare approvato dal CD SIBioC in data 12 febbraio 2001 che viene pubblicato per essere portato alla conoscenza di tutti i soci in attesa di commenti ed osservazioni. Tutti i suggerimenti vanno inviati entro 6 mesi dalla data di pubblicazione a: Dott.ssa Maria Stella Graziani, Laboratorio di Chimica Clinica, Azienda Ospedaliera Borgo Trento, P.zza Stefani, 1 - 37126 Verona - e-mail: mariastella.graziani@mail.azosp.vr.it

cui è importante utilizzare urine che abbiano soggiornato in vescica il meno possibile. Il campione di elezione è dunque costituito da urine fresche, (consigliato il secondo campione del mattino, raccolto tra le ore 6 e le ore 9) (4); si può valutare l'opportunità di aggiungere sodio azide (1%) al fine di limitare la proliferazione batterica.

L'urina può essere utilizzata come tale se si dispone di un metodo di sufficiente sensibilità (vedi avanti); in caso sia clinicamente indicato ricercare la proteina di BJ con la maggiore sensibilità possibile, può essere necessario concentrare il campione.

Metodo

Il metodo scelto deve permettere la verifica delle due caratteristiche della proteina di BJ (catene leggere *libere monoclonali*). Quindi dovrà essere eseguita una immunofissazione che abbinata una elettroforesi (atta a verificare l'omogeneità molecolare della proteina) ad una tipizzazione immunologica (atta a verificare che si tratta di catene leggere libere) (3, 5, 6). L'elettroforesi deve essere di buon qualità e soddisfare i criteri già proposti dalla Commissione 05 della SIBioC (7).

Gli antisieri da utilizzare sono anti κ e anti λ totali con l'aggiunta dell'antisiero anti catena pesante della immunoglobulina presente nel siero secondo lo schema di Fig 1.

Gli antisieri anti catene leggere libere non sono consigliabili in quanto spesso sono a basso titolo, di scarsa avidità, costosi e possono presentare cross-reattività con le catene leggere legate. Il loro uso può trovare indicazione in casi particolari, quali ad esempio l'identificazione di una proteina di BJ che co-migra con l'immunoglobulina intatta.

La colorazione del tracciato immunofissato con coloranti colloidali (oro o Coomassie) consente il raggiungimento di sensibilità adeguate (< 10 mg/L) senza dover procedere alla concentrazione del campione (8).

Utilizzando metodi che abbinano elevata sensibilità con una buona risoluzione, è possibile osservare con una certa frequenza la comparsa di una serie di bande multiple (prevalentemente con antisieri anti κ , ma anche con antisieri anti λ) che non hanno rilevanza clinica ma che possono essere confusi con proteina di BJ. In realtà sono il risultato della escrezione di catene leggere libere policlonali che compaiono in individui con riassorbimento tubulare ridotto (9,10). Sono distinguibili dalla proteina di BJ perché il tracciato è tipico e ripetitivo con bande regolarmente spaziate tra di loro.

I metodi quantitativi immunochimici non sono consigliabili perché le seguenti ragioni (11,12):

- nel saggio quantitativo, gli antisieri non discriminano fra catene leggere monoclonali e policlonali né fra catene leggere libere e legate (a meno di utilizzare antisieri anti catene libere)
- l'antigene usato come calibratore è policlonale e perciò diverso da quello del campione che è monoclonale; viene quindi a mancare il requisito essenziale per l'accuratezza di un test immunologico e cioè il parallelismo tra antigene nel calibratore e antigene nel campione
- la proteina di BJ può essere presente in quantità molto elevata tanto da dare problemi di eccesso di antigene
- la proteina di BJ è spesso presente sotto forma di aggregati di dimensioni variabili, il che può rendere la misura immunochimica della proteina poco ripetibile.

Per la ricerca della proteina di BJ sono ugualmente da scoraggiare:

- l'utilizzo di metodi per la misura delle proteine totali (siano essi precipitanti o di dye-binding) perché poco sensibili e poco accurati
- gli sticks in uso per la rilevazione delle proteine nell'ambito dell'esame standard delle urine; tale metodo si basa sull'errore proteico degli indicatori ed è sensibile quasi esclusivamente alla albumina
- il test al calore, che va ricordato solo per il suo valore storico

QUANTIFICAZIONE

La quantificazione della proteina di BJ riveste una certa importanza nella diagnostica differenziale delle condizioni associate a presenza di componente monoclonale e nel monitoraggio di questi pazienti (3)

Questo è tuttavia un problema che non è risolvibile con le attuali tecniche di laboratorio.

I metodi immunochimici non sono consigliabili per le stesse ragioni esposte nella sezione "RICERCA".

Le linee-guida del College of American Pathologists (CAP) per la gestione del soggetto con CM (6) suggeriscono la seguente procedura:

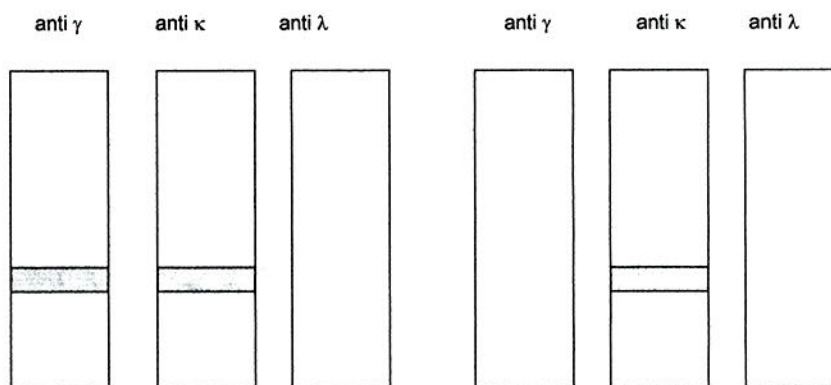
- determinazione della proteinuria delle 24 ore
- tracciato elettroforetico ed immunofissazione per la verifica della presenza di proteina di BJ
- determinazione della percentuale densitometrica del picco elettroforetico dovuto alla proteina di BJ
- espressione di tale percentuale in rapporto alle proteine totali per ricavare i g/L di proteina di BJ

Questa procedura è criticabile per molti aspetti:

- i metodi attualmente in uso per la misura delle proteine totali urinarie non presentano sensibilità e linearità uguale per tutte le proteine presenti nel campione, in particolare le microproteine e la proteina di BJ presentano una rilevabilità non soddisfacente. La proteinuria totale di un campione con proteina di BJ può quindi essere poco accurata
- analogamente, le diverse proteine presentano affinità diverse per i coloranti utilizzati per la colorazione dei tracciati elettroforetici e non è provato che ad intensità di colorazione uguali corrispondano uguali quantità di proteina specialmente se si utilizzano coloranti colloidali
- spesso la proteina di BJ si presenta frazionata in più bande elettroforetiche in modo che la proteina stessa è difficilmente isolabile dal tracciato e di difficile valutazione densitometrica

Nonostante i problemi segnalati, la procedura densitometrica proposta dal CAP è l'unica utilizzabile in caso di richiesta di quantificazione della proteina BJ, non essendo disponibili valide alternative. E' tuttavia consigliabile che il follow-up sia eseguito sempre nello stesso laboratorio per minimizzare la variabilità analitica.

Paziente con IgG kappa sierica



Proteina di Bence Jones: Negativa

Proteina di Bence Jones: Positiva

BIBLIOGRAFIA

1. Berggård I, Edelman GM. Normal counter parts to Bence Jones proteins: free L polypeptide chains of human γ globulin. Proc Natl Acad Sci USA 1963;49:330-7
2. Solomon A. Review: light chains immunoglobulin. Structural-genetic correlates. Blood 1986;68:603-7
3. Kyle RA. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. Serum and urine assays. Arch Pathol Lab Med 1999;123:114-8
4. Hofmann W, Guder WG. A diagnostic programme for quantitative analysis of proteinuria. J Clin Chem Clin Biochem 1989;27:589-600
5. Merlini G, Aguzzi F, Whicher J. Monoclonal gammopathies. J Internat Fed Clin Chem 1997;9:171-6

6. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, Gorevic PD, Kyle RA, Tomar RH. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999;123:106-7
7. COM 05 (Aguzzi F, Fenili D, Montalbetti N, Petrini C, Salvatore F, Tarantino M). L'elettroforesi delle sieroproteine 1 e 2. Raccomandazioni provvisorie. Biochim Clin 1985;9:1127-34
8. Aguzzi F, Bergami MR, Gasparro C, Merlini G. High sensitivity electrophoretic method for the detection of Bence Jones protein and for the study in unconcentrated urine. Ann Clin Biochem 1993;30:287-92
9. Harrison HH. The "ladder light chain" or "pseudooligoclonal" pattern in urinary immunofixation electrophoresis (IFE) studies: a distinctive IFE pattern and an explanatory hypothesis relating it to free polyclonal light chains. Clin Chem 1991;37:1559-64
10. Mac Namara EM, Aguzzi F, Petrini C, Higginson J, Gasparro C, Bergami MR, Bianchi G, Whicher JT. Restricted electrophoretic heterogeneity of immunoglobulin light chains in urine. A cause of confusion with Bence Jones protein. Clin Chem 1991;37:1570-4
11. Tillyer CR. The estimation of free light chains of immunoglobulins in biological fluids. Int J Clin Lab Res 1992;22:152-8
12. Boege F. Measuring Bence Jones protein with antibodies against bound immunoglobulin light chains: how reliable are the results?. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1993;31:403-5

Appendice A

CENNI DI FISIOLOGIA DELLE IMMUNOGLOBULINE (Ig)

Struttura

La molecola immunoglobulinica consiste di due identiche catene polipeptidiche "pesanti" (CP) - massa molecolare circa 50 kDa - e due identiche catene polipeptidiche "leggere" (CL) - massa molecolare circa 22 kDa, legate insieme da un numero variabile di ponti disolfuro e da legami non covalenti.

Le CP sono costituite da 3 o 4 regioni ("domains") definite costanti, dotate di notevole omologia, e da una regione variabile, nella porzione N-terminale. Le CL contengono una regione costante e una variabile. Le differenti caratteristiche strutturali ed antigeniche della parte costante delle CP determinano la presenza di differenti classi e sottoclassi immunoglobuliniche: IgG (ulteriormente suddivise in IgG 1, 2, 3, 4), IgA (IgA1 e IgA2), IgM, IgD, IgE, mentre le CL sono distinte in due tipi: kappa e lambda, uno solo dei quali è presente nella molecola completa.

Sulla base della omologia di porzioni della regione variabile, sia le CL che le CP sono suddivise in sottoclassi: 4 per le CL k, 6 per le CL λ e 6 per le CP. Gli aminoacidi contrapposti delle porzioni variabili delle due catene, pesante e leggera, formano il sito combinatorio per l'antigene (2 siti per ogni Ig). Alle funzioni effettrici - legame ai recettori cellulari, attivazione del complemento, fissazione del complemento, ecc. - sono invece deputate le regioni costanti (frammento Fc).

Sintesi

Le CP e CL della molecola immunoglobulinica sono sintetizzate su differenti ribosomi, sotto il controllo di geni diversi (cromosoma 14 per le CP, cromosoma 2 per le CL k e 22 per le λ). L'assemblaggio della molecola avviene dopo la liberazione delle singole catene nelle cisterne del reticolo endoplasmico. Le CL sono sintetizzate in leggero eccesso rispetto alle pesanti; ciò determina il passaggio nel circolo e l'eliminazione per via renale di una parte di questo "surplus" di CL policlonali, essendo esse per la maggior parte riassorbite e catabolizzate a livello del tubulo renale prossimale.

Catabolismo delle catene leggere

Il rene è la sede del catabolismo delle CL (1-3). Le CL, sia poli che monoclonali, al pari di altre proteine di massa molecolare inferiore a 40 kDa sono liberamente filtrate dal glomerulo. Le microproteine soggette a riassorbimento tubulare comprendono enzimi (per es. ribonucleasi, lisozima), immunoglobuline (catene leggere), ormoni peptidici (per es. insulina, ormone della crescita, paratormone), altre microproteine (beta2-microglobulina, alfa1-microglobulina, retinol binding protein ecc.). La permeabilità della membrana glomerulare alle microproteine è variabile in funzione delle loro caratteristiche fisico-chimiche, quali massa molecolare, punto isoelettrico (pI), grado di glicosilazione ecc.

Riduzioni anche modeste del filtrato glomerulare comportano precoci incrementi di concentrazione plasmatica delle microproteine.

Dall'ultrafiltrato le microproteine sono captate dalle cellule del tubulo prossimale, dove sono degradate a livello lisosomiale a oligopeptidi e aminoacidi, i quali vengono immessi in circolo e riutilizzati. In condizioni normali il processo di riassorbimento tubulare può essere schematicamente così descritto:

- legame e adesione della microproteina alla membrana luminale della cellula tubulare
- segregazione della proteina in vescicole endocitosiche
- migrazione delle vescicole dal margine apicale all'interno della cellula
- fusione con il lisosoma e contatto con gli enzimi idrolitici
- degradazione enzimatica della proteina, processo che può durare da pochi minuti a giorni a seconda della proteina.

Non è stato dimostrato che a livello di membrana luminale cellulare vi siano recettori specifici per ciascuna proteina od anche per gruppi di proteine, perciò non si può parlare di un processo selettivo dipendente da carrier specifici. Tuttavia esiste una selettività di legame dipendente dall'interazione tra carica della proteina e cariche negative della superficie cellulare assorbente. Il legame può dipendere dalle cinetiche di interazione fra gruppi cationici della molecola proteica e siti anionici presenti sulla superficie di tutti i tipi di cellule, comprese le cellule tubulari renali. Oltre alla carica, interferiscono la dimensione e la forma. La dimostrazione che l'albumina è riassorbita meno dell'insulina e della ribonucleasi e che gli aminoacidi cationici aumentano l'escrezione delle microproteine sarebbe a supporto di questo tipo di selettività. Recentemente è stato ipotizzato che il recettore glicoproteico "cubilina" (gp280), distribuita lungo i percorsi degli "scavenger" endocitici, possa avere un ruolo fisiologico come sito di legame per le CL a livello di orletto a spazzola delle cellule renali (4).

BIBLIOGRAFIA

1. Maack T, Johnson V, Kau ST, Figueiredo J, Sigulem D. Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular weight proteins: A review. *Kidney Int* 1979;16:251-70.
2. Sumpio BE, Maack T. Kinetics, competition, and selectivity of tubular absorption of proteins. *Am J Physiol* 1982;243:379-92.
3. Solling K. Free light chains of immunoglobulins. *Scan J Clin Lab Invest* 1981;157 (Suppl):1-83.
4. Batuman V, Verroust PJ, Navar GL et al. Myeloma light chains are ligands for cubilin (gp 280). *Am J Physiol* 1998;275:246-54.

Appendice B

MANIFESTAZIONI CLINICHE CAUSATE DALLA PROTEINA DI BENCE JONES

Come accade per alcune componenti monoclonali (CM) costituite da Ig complete, anche la proteina di BJ può esercitare effetti dannosi su tessuti, organi o apparati a causa di sue proprietà fisico-chimiche. I meccanismi patogenetici sono vari e spesso poco chiari. Poiché non tutte le proteine di BJ inducono necessariamente manifestazioni cliniche specifiche, e quando sono patogene esplicano effetti dannosi differenti, i fattori che determinano il danno sono in gran parte dipendenti da proprietà fisico-chimiche e funzionali della singola catena leggera monoclonale (come emerge da dati clinici e sperimentali) ma possono essere favoriti o esaltati da condizioni estrinseche legate all'ospite.

1. Nefrotossicità da catene leggere

Il rene è la sede del catabolismo delle catene leggere (sia poli che monoclonali) e rappresenta pertanto l'organo più colpito dall'effetto patogeno della proteina di BJ. Tuttavia, sono stati descritti casi con proteinuria di BJ di elevata concentrazione e lunga durata senza danno renale (1,2).

I quadri clinici legati alla nefrotossicità delle proteina di BJ sono:

- Rene da mieloma

- Malattia da deposizione di catene leggere
- Amiloidosi
- Sindromi da alterata funzione dei tubuli renali.

1.1 Rene da mieloma

L'insufficienza renale, sia acuta che cronica, compare in circa il 50% dei pazienti affetti da mieloma multiplo (3) ed è imputabile per il 70-80% alle manifestazioni cliniche e al peculiare quadro istopatologico del cosiddetto rene da mieloma. La denominazione anglosassone di "light chain cast nephropathy" sottolinea il ruolo patogenetico delle catene leggere (monoclonali) nel determinismo della nefropatia, caratterizzata da proteinuria e precipitazione di materiale proteico sotto forma di cilindri nei tubuli distali e nei tubuli collettori.

Dal punto di vista morfologico, questi cilindri appaiono al microscopio ottico grossi, densi, rifrangenti con un caratteristico aspetto multilamellare e contorni fratturati (4), eosinofili e PAS positivi. La reazione cellulare comprende: cellule epiteliali, linfociti, talvolta polimorfonucleati e cellule giganti multinucleate, di natura monocitaria o macrofagica, che spesso inglobano frammenti di cilindri. Al microscopio elettronico alcuni cilindri appaiono densi ed omogenei, altri grossolanamente fibrillari (fibrille diverse da quelle dell'amiloido). Cristalli allungati di varia dimensione si trovano nel lume e a volte anche nelle cellule dell'epitelio tubulare (5). La catena leggera monoclonale responsabile della proteinuria di BJ può essere evidenziata nei cilindri con metodi immunocistochimici in circa il 50% dei casi (6) ed è spesso accompagnata da altre proteine; sempre presente è la proteina di Tamm-Horsfall, mentre saltuariamente si trovano albumina, la catena leggera non implicata, catene pesanti, C3 ecc. Alla presenza di cilindri si associano alterazioni morfologiche dei tubuli renali con vari gradi di degenerazione cellulare (appiattimento dell'epitelio, desquamazione cellulare, necrosi cellulare).

Per quanto riguarda i meccanismi che inducono la precipitazione intraluminare della catena leggera monoclonale sono state avanzate varie ipotesi. Poiché non esiste uno stretto parallelismo fra proteinuria di BJ e precipitazione, si ritiene che soltanto alcuni tipi di BJ siano particolarmente predisposti a questo fenomeno e questo è stato suffragato da dati sperimentali nell'animale (7,8).

E' stato rilevato che l'effetto patogeno è attribuibile alla porzione variabile delle catene leggere, che è responsabile delle proprietà fisico-chimiche e funzionali che le distinguono le une dalle altre. In un primo momento si era ritenuto (9) che le proteine di BJ con pl più elevato (> di 5) avessero una maggior tendenza a precipitare per l'interazione elettrostatica con la proteina di Tamm-Horsfall, il cui pl è 3.5. Ma successivi studi sia clinici che sperimentali hanno escluso qualsiasi correlazione fra pl della proteina e insorgenza di insufficienza renale (3,10-13). Oltre alla possibile influenza di precipue caratteristiche fisico-chimiche della proteina di BJ, hanno spesso un ruolo favorente alcuni fattori legati all'ospite, quali:

- disidratazione
- ipercalcemia
- iperuricemia
- infezioni delle vie urinarie
- farmaci nefrotossici.

Da ultimo, si può ragionevolmente ritenere destituito di ogni influenza l'uso di mezzi di contrasto, tanto più che sono ormai stati abbandonati quelli ionici, suscettibili di interagire con la proteina di BJ. E' molto più verosimile ritenere che i danni renali osservati in passato derivassero dai regimi fortemente disidratanti ai quali si sottoponevano i pazienti per gli esami pielografici.

2. Nefropatie da deposizione di catene leggere

Mentre il rene da mieloma appartiene alla patologia legata alla propensione di determinate catene leggere monoclonali a precipitare nel lume dei tubuli renali, un altro gruppo di affezioni sistemiche che colpiscono preferenzialmente il rene, ma possono manifestarsi anche a livello di altri organi e apparati, dipende dalla capacità della proteina patologica di depositarsi negli spazi extracellulari.

Sono descritte due forme distinte di depositi di catene leggere monoclonali: una fibrillare, tipica dell'amiloide, e una non fibrillare, che caratterizza la malattia da deposizione di catene leggere

2.1 Malattia da deposizione di catene leggere (LCDD)

Anche se lo spettro della patologia renale associata a depositi non fibrillari di componenti monoclonali comprende forme con depositi di catene leggere isolate o accompagnate da Ig completa, e altre caratterizzate dalla presenza di catene pesanti ("non amyloid monoclonal immunoglobulin deposition disease": NAMIDD) (14), queste note riguardano la forma più frequente, cioè la malattia da deposizione di catene leggere, la cui identità è stata chiarita nel 1976 con metodi di immunofluorescenza (15), anche se da anni nei portatori di mieloma erano state descritte alterazioni glomerulari con aspetto lobulare simili a quelle della glomerulosclerosi di Kimmestiel-Wilson della nefropatia diabetica. I depositi sono localizzati prevalentemente nelle membrane basali e nelle pareti dei vasi, caratterizzati da materiale non fibrillare, non congofilico, PAS positivo, argirofilo finemente granuloso alla microscopia elettronica.

Al microscopio ottico il coinvolgimento renale può assumere aspetti eterogenei: i glomeruli possono avere apparenza normale o mostrare vari gradi di espansione mesangiale fino alla glomerulopatia nodulare. I depositi sono sempre presenti a livello tubulare e vascolare. Per la diagnosi è necessario utilizzare i metodi immunoistochimici, preferibilmente l'immunofluorescenza su tessuto congelato. Anche se le manifestazioni cliniche sono spesso legate al danno renale, i depositi sono stati dimostrati in altri organi (fegato, polmone, cute ecc.), accompagnati in alcuni casi da sintomatologia correlata.

La malattia si manifesta con proteinuria in genere modesta, ma a volte di tipo nefrosico, senza ematuria e ipertensione, associata a insufficienza renale rapidamente ingravescente. In circa il 25% dei pazienti non è presente una neoplasia linfoproliferativa sintomatica; tuttavia mediante lo studio immunologico del midollo, è possibile evidenziare una popolazione monoclonale, ancorché di entità modesta, che sintetizza catene leggere del tipo riscontrato nei depositi. La proteinuria di BJ può essere a bassa concentrazione, a volte non evidenziabile se non ricorrendo a tecniche molto sensibili.

Per quanto riguarda il meccanismo fisiopatologico che induce il fenomeno di adesione e deposizione tissutale, alcuni studi sulla struttura delle molecole hanno evidenziato anomalie strutturali quali: dimensioni anomale (catene più lunghe o più corte), tendenza alla formazione di polimeri, anomalie della glicosilazione. Esistono in letteratura numerosi lavori riguardanti l'analisi strutturale della proteina anomala implicata in malattia da deposizione, determinata o direttamente o mediante studi a livello genico o biosintetici. I risultati più rilevanti sembrano riguardare l'identificazione di sostituzioni aminoacidiche che determinano una aumentata idrofobicità potenzialmente in grado di destabilizzare la molecola proteica a causa di una conformazione anomala (16-21).

2.2 Amiloidosi AL

Il termine amiloidosi è un'espressione generica che comprende differenti patologie caratterizzate da depositi tissutali chimicamente eterogenei. La caratteristica comune a tutte le forme di amiloidosi, indipendentemente dalla composizione biochimica, è la presenza, sistemica o localizzata, di depositi fibrillari negli spazi extracellulari. Tutti i tipi di fibrille condividono le seguenti proprietà:

- struttura secondaria prevalentemente a foglietto beta antiparallelo
- birifrangenza verde mela alla luce polarizzata dopo colorazione con il rosso Congo
- struttura quaternaria fibrillare con aspetti peculiari in microscopia elettronica.

Inoltre è sempre dimostrabile nell'amiloide di qualunque tipo biochimico una proteina di elevato peso molecolare (250 kDa), glicosilata, chiamata "amyloid P component". Anche l'apoproteina E sembra costantemente associata all'amiloide, probabilmente contribuendo, insieme alla P-component, alle modificazioni conformazionali che favoriscono la precipitazione in fibrille della proteina amiloidogenica. (22)

Nell'amiloidosi AL, le fibrille sono costituite prevalentemente da frammenti di catene leggere monoclonali, a volte associati alla catena leggera completa. I frammenti con massa molecolare di 5-23 kDa, comprendono la regione amino-terminale della catena

leggera (regione variabile più circa 50 aminoacidi della regione costante) (8).

Nell'amiloidosi AL è stata dimostrata la prevalenza di catene leggere λ (con significativa preponderanza dei gruppi λ 6 e λ 3), una maggior frequenza di catene leggere con pl acido, e la presenza nel siero e nelle urine dei pazienti affetti, di frammenti di CL (23). Lo studio strutturale delle CL implicate nella formazione delle fibrille, pur non avendo rivelato nessun aspetto comune caratteristico, ha messo in evidenza, nel confronto con CL non amiloidogeniche, sostituzioni aminoacidiche peculiari che possono destabilizzare il "folding state" (24).

Esiste una forma di amiloidosi AL associata al mieloma multiplo (6-15% dei casi di mieloma) e una forma detta primaria con modesta infiltrazione plasmacellulare del midollo osseo (inferiore al 10%). Mediante l'immunofluorescenza è possibile dimostrare la monoclonalità delle plasmacellule. Trattandosi di malattia sistemica, la deposizione può coinvolgere qualsiasi organo (cuore, reni, fegato, intestino, tessuto nervoso e muscolare) e la sintomatologia deriva dal danno provocato all'organo colpito.

Data la complessità di questa patologia, non è possibile trattare nel dettaglio le manifestazioni cliniche ad essa associate.

L'interessamento renale riguarda il 75-90% dei casi ed esordisce in un terzo dei pazienti con sindrome nefrosica dovuta al deposito di amiloide a livello glomerulare; l'evoluzione è verso l'insufficienza renale, causa di morte del 10-25% dei pazienti. In circa la metà dei soggetti, la morte sopravviene per insufficienza cardiaca congestizia, causata da depositi di amiloide nel tessuto cardiaco, presenti in circa il 90% dei pazienti colpiti.

La proteina di BJ urinaria è spesso presente in basse concentrazioni e necessita di ricerca con tecniche ad alta sensibilità, con le quali è possibile identificarla in quasi il 90% dei pazienti.

E' opportuno ricordare che sono stati descritti casi di contemporanea presenza di depositi fibrillari e non fibrillari di CL monoclonali nello stesso paziente (amiloidosi associata a malattia da deposizione di catene leggere). A questo proposito, alcuni Autori (25) ritengono che forse non ci sono differenze strutturali fra catene leggere che producono amiloide e quelle che determinano depositi non fibrillari. Secondo questi AA le catene leggere in grado di formare depositi tissutali potrebbero costituire uno spettro con un estremo rappresentato da quelle capaci di formare soltanto amiloide, l'altro da quelle che si depositano in forma più amorfa, non fibrillare, e con un gruppo centrale capace di formare entrambi i depositi. Un'ipotesi alternativa suggerirebbe che tutte o quasi le proteine che formano fibrille passino attraverso una fase di depositi non fibrillari e non congolfilici, di durata variabile in dipendenza dalla loro struttura primaria. Saranno necessari altri studi per risolvere questo problema.

2.3 Sindromi da alterata funzione dei tubuli renali

Oltre al danno renale anatomico, documentabile con dati istologici e immunoistologici, provocato dalla proteina di BJ, sono state descritte situazioni patologiche legate ad alterazioni funzionali del tubulo, indotte dalla BJ (26), in pazienti senza riduzione della funzione renale e con biopsie renali negative. Le manifestazioni cliniche legate a sofferenza del tubulo prossimale configurano la sindrome di Fanconi dell'adulto (57 casi descritti fino ad oggi sec. Messiaen et al.), (27) con vari gradi di glicosuria normoglicemica, aminoaciduria, fosfaturia, lisozimuria e acidosi tubulare prossimale. E' associata più frequentemente a BJ di tipo kappa e può precedere la manifestazione clinica del mieloma anche di alcuni anni.

Questa patologia è stata nel passato attribuita ad una particolare forma di discrasia plasmacellulare, caratterizzata, oltre che dalla proteinuria di BJ, da una lenta progressione della neoplasia e da una tendenza alla cristallizzazione della componente monoclonale nelle cellule del tubulo prossimale, senza formazione di cilindri nel tubulo distale.

La disfunzione tubulare distale è caratterizzata per lo più da acidosi tubulare distale, più raramente da diabete insipido nefrogenico (28). Sono descritti anche casi di associazione delle due forme (29).

Sperimentalmente, utilizzando fettine di tessuto renale incubate in presenza di BJ, è stata dimostrata una riduzione di processi metabolici e un'inibizione dell'attività dell'enzima ATP-asi Na,K dipendente (30), e studi clinici diversi hanno riportato un effetto tossico

delle catene leggere monoclonali sia sul riassorbimento tubulare di microproteine (31), che su varie altre funzioni tubulari (escrezione acido urico, fosfati, osmolalità, capacità di acidificazione ecc.) (32).

Le alterazioni funzionali regrediscono se con la terapia si abolisce l'escrezione di proteina di BJ, a riprova dell'effetto tossico della proteina sul tubulo. Anche se raramente, alla disfunzione tubulare possono seguire osteomalacia e acidosi metabolica cronica. Da sottolineare che la ridotta capacità di concentrazione e il diminuito riassorbimento del Na possono predisporre alla disidratazione con tutte le conseguenze che comporta (rene da mieloma). Dagli studi strutturali di una CL kappa monoclonale implicata nella sindrome di Fanconi è emerso un comportamento peculiare: oltre alla sua capacità di formare cristalli nelle cellule tubulari e nelle plasmacellule, la porzione variabile, ottenuta dal frammento nativo dopo trattamento enzimatico, si dimostrava del tutto resistente ad ulteriore proteolisi enzimatica, contrariamente ad altre CL monoclonali kappa (33).

Del tutto recentemente un lavoro (27) su 11 casi di sindrome di Fanconi associata ad eliminazione di CL resistenti alla catepsina B (enzima lisosomiale), ha messo in evidenza che, in contrasto con una certa eterogeneità clinico-patologica, i dati genetici e biochimici mostravano una sorprendente omogeneità: 1) tutte le BJ erano di tipo kappa, 2) 8 appartenevano al I sottogruppo di variabilità (V kappa I), molto verosimilmente derivate da solo 2 geni della linea germinale (LC02/012 e LC08/018), 3) in ben 5 delle sequenze derivate da LC02/012, vi era un insolito residuo idrofobico o non polare in posizione 30. Gli AA ipotizzano che questa insolita struttura primaria conferisca alla molecola la resistenza alla proteolisi che potrebbe spiegare l'accumulo di CL nel compartimento endocitico della cellula prossimale e il conseguente deficit funzionale.

3. Altre nefropatie da deposizione di Ig

Anche se non correlate alla proteina di BJ, meritano un breve cenno due entità di descrizione relativamente recente e bassa incidenza (1% delle glomerulopatie) (34).

La *glomerulopatia fibrillare non amiloidotica* è caratterizzata da depositi di fibrille a livello del mesangio e delle anse capillari glomerulari, che presentano spessore maggiore rispetto a quello dell'amiloide, sono negative al rosso Congo, prive della caratteristica organizzazione ultrastrutturale e costituite prevalentemente da Ig policlonali.

Nelle *glomerulopatie immunotattoidi* i depositi sono invece rappresentati nel 50-80% dei casi da IgGκ o IgGλ monoclonali, non sono sistemici ed hanno struttura cristallina o tatteoide. Inoltre una particolare forma di glomerulopatia immunotattoide definita "glomerulonephritis with organized microtubular monoclonal Ig deposits" - GOMMID- può essere associata a leucemia linfatica cronica o linfoma non Hodgkin. Nelle forme immunotattoidi alla biopsia si riscontra glomerulonefrite membranosa, spesso associata a proliferazione mesangiale segmentale oppure a glomerulonefrite membrano-proliferativa lobulare con depositi di Ig monotipiche. Solo raramente è identificabile una CM circolante. Le manifestazioni cliniche comprendono proteinuria, spesso nel range nefrosico, microematuria e ipertensione. La progressione verso l'insufficienza renale è più frequente nella glomerulopatia fibrillare.

BIBLIOGRAFIA

1. Kyle RA, Greipp PR. Idiopathic Bence Jones proteinuria. *New Engl J Med* 1998;306:564-67.
2. Woodruff R, Sweet B. Multiple myeloma with massive Bence Jones proteinuria and preservation of renal function. *Aust N Z J Med* 1977;7:60-2.
3. Ascari E, Merlini G, Ricciardi A. Il mieloma multiplo. Roma: L. Pozzi Editrice 1989.
4. Pirani CL, Silva FG, Appel GB. Interstitial disease in multiple myeloma and other non renal neoplasia. In: Contran RS, Brenner BM, Stein JH eds. *Tubulo-Interstitial Nephropathies*. London: Churchill Livingstone, 1983:208-21.
5. Pirani CL, Silva F, D'Agati V et al. Renal lesions in plasma cells dyscrasia: ultrastructural observation. *Am J Kidney Dis* 1987;10:208-21.
6. Picken MM, Shen S. Immunoglobulin light chains and the kidney: an overview. *Ultrastructural Pathol* 1994;18:105-12.
7. Koss MN, Pirani CL, Osserman EP. Experimental Bence Jones cast nephropathy. *Lab Invest* 1976;34:579-91.
8. Solomon A, Weiss DT. A perspective of plasma cell dyscrasia: clinical implication of monoclonal

- light chains in renal disease. In: Minetti L, D'Amico G, Ponticelli C eds. The kidney in plasma cell dyscrasia. Dordrecht: Kluwer Acad Publ, 1988:3-18.
9. Clyne DH, Pesce AJ, Thompson RE. Nephrotoxicity of Bence Jones proteins in the rat: Importance of protein isoelectric point. *Kidney Int* 1979;16:345-52.
 10. Coward RA, Delamore IW, Mallick MP, Robinson EL. The importance of urinary immunoglobulin light chain isoelectric point in nephrotoxicity in multiple myeloma. *Clin Sci* 1984;66:229-32.
 11. Norden AGW, Fynn FV, Fulcher LM, Richards JDM. Renal impairment in myeloma: negative association with isoelectric point of excreted Bence Jones protein. *J Clin Pathol* 1989;42:59-62.
 12. Melcion C, Mougnot B, Baudouin B et al. Renal failure in myeloma; relationship with isoelectric point of immunoglobulin light-chains. *Clin Nephrol* 1984;22:138-43.
 13. Smolens P, Barnes JL, Stein JH. Effect of chronic administration of different Bence Jones proteins on rat kidney. *Kidney Int* 1986;30:874-82.
 14. Gallo G, Picken M, Buxbaum J, Frangione B. The spectrum of monoclonal immunoglobulin deposition disease associated with immunocytic dyscrasias. *Semin Hematol* 1989;26:234-45.
 15. Randall RE, Williamson WC, Mullinax F et al. Manifestations of systemic light chain deposition. *Am J Med* 1976;60:293-99.
 16. Decourt C, Cogne M, Rocca A. Structural peculiarities of a truncated V kappa III immunoglobulin light chain in myeloma with light chain deposition disease. *Clin Exp Immunol* 1996;106:357-61.
 17. Vidal R, Goni F, Stevens F et al. Somatic mutations of the L 12 a gene in V-kappa (1) light chain deposition disease; potential effects on aberrant protein conformation and deposition. *Am J Pathol* 1999;155:2009-17.
 18. Ling NR. Immunoglobulin production by cultured human lymphocytes. *Protein Sci* 1999;8:509-17.
 19. Deret S, Chomilier J, Huang DB et al. Molecular modeling of immunoglobulin light chains implicates hydrophobic residues in non amyloid light chain deposition diseases. *Protein Eng* 1997;10:1191-7.
 20. Gallo G, Goni F, Boctor F et al. Light chain cardiomyopathy. Structural analysis of the light chain tissue deposits. *Am J Pathol* 1996;148:1397-406.
 21. Stevens FJ, Argon Y. Pathogenic light chains and the B-cell repertoire. *Immunol Today* 1999;20:451-7.
 22. Gallo G, Wisniewsky T, Choi-Miura NH et al. Potential role of apolipoprotein E in fibrillogenesis. *Am J Pathol* 1994;145:526-30.
 23. Bellotti V, Merlini G, Bucciarelli E, Perfetti V, Ascari E. Relevance of class, molecular weight and isoelectric point in predicting human light chain amyloidogenicity. *Br J Haematol* 1990;74:65-9.
 24. Bellotti V, Mangione P, Merlini G. Immunoglobulin light chain amyloidosis. The archetype of structural and pathogenic variability. *J Struct Biol* 2000;130:280-9.
 25. Buxbaum J, Gallo G. Non-amyloidotic monoclonal immunoglobulin deposition disease. Light-chain, heavy-chain, and light-and heavy-chain deposition disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999;13:1235-48.
 26. Fang LST. Light chain nephropathy. *Kidney Int* 1985;27:582-92.
 27. Messiaent T, Deret S, Mougnot B et al. Adult Fanconi syndrome secondary to light chain gammopathy. Clinicopathologic heterogeneity and unusual features in 11 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:135-54.
 28. Maldonado JE, Velosa JA, Kyle RA et al. Fanconi syndrome in adults. A manifestation of latent myeloma. *Am J Med* 1975;58:35-64.
 29. Smithline N, Kassirer JP, Cohen JJ. Light chain nephropathy. Renal tubular dysfunction associated with light chain proteinuria. *New Engl J Med* 1972;94:71-4.
 30. Mc Geoch J, Smith JF, Ledingham J, Ross B. Inhibition of active transport sodium-potassium ATP-ase by myeloma protein. *Lancet* 1978;2:17.
 31. Cooper EH, Forbes MA, Crockson RA, Mac Lennan ICM. Proximal renal tubular function in myelomatosis: observations in the fourth MRC trial. *J Clin Pathol* 1984;37:848-52.
 32. Colussi G, Barbarano L, Airaghi C et al. Clinical spectrum of tubular disorders from light chains. In: Minetti L, D'Amico G, Ponticelli C eds. The kidney in plasma cell dyscrasia. Dordrecht: Kluwer Acad Publ, 1988:191-209.
 33. Aucouturier P, Bauwens M, Khamlichi AA et al. Monoclonal Ig L chain and L chain V domain fragment crystallization in myeloma-associated Fanconi's syndrome. *J Immunol* 1993;150:3561-8.
 34. Ronco P, Aucouturier P, Mougnot B. Plasma cell dyscrasia-related glomerulopathies and Fanconi syndrome: a molecular approach. In: *Attualità Nefrologiche & Dialitiche. Atti del XXXI Corso di Aggiornamento in nefrologia e metodiche dialitiche dell'Ospedale San Carlo Borromeo di Milano*. A cura di: G D'Amico, C Bazzi, G Colasanti. Milano: Wichtig Editore, 1999.