



## **Samenvatting proefschrift Niels V. Rekers**

“Predicting outcome of acute kidney transplant rejection using molecular markers”

**Promotie: 3 december 2014  
Universiteit Leiden**

**Promotor:**  
Prof. dr. F.H.J. Claas

**Co-promotor:**  
Dr. M. Eikmans  
Dr. I.M. Bajema

Het optreden van acute afstotingsreacties gericht tegen de donornier is een van de belangrijkste risicofactoren voor adversieve transplantatie uitkomsten. Acute rejectie episodes zijn geassocieerd met een verminderde kans op transplantaatoverleving en de ontwikkeling van chronische transplantaat dysfunctie. Na de diagnose van een acute rejectie episode blijft het echter lastig om aan de hand van klinische parameters en histopathologische bepalingen het risico op nadelige transplantatie uitkomsten te voorspellen. In dit proefschrift worden biomarkers beschreven die de beoordeling van het risico op transplantaatverlies en de respons op anti-rejectie behandeling mogelijk maken. Moleculaire technieken zijn vitaal voor het identificeren van biomarkers voor transplantatie uitkomst.

Moleculaire onderzoeksmethoden, zoals kwantitatieve polymerase-kettingreactie (qPCR) en microarray analyse, bieden de mogelijkheid om snelle, sensitieve, en specifieke bepalingen te doen voor het detecteren van verschillen in genexpressie tussen patiëntengroepen. Na niertransplantatie vormen nierbiopten een belangrijke bron van patiëntmateriaal voor ribonucleïnezuur (RNA) extractie en daaropvolgende genexpressie analyses. De betrouwbaarheid van moleculaire technieken kan echter beïnvloed worden door de kwaliteit en kwantiteit van het geïsoleerd RNA. Daarom zijn in hoofdstuk 2 de optimale protocollen voor de opslag van patiëntmateriaal, RNA extractie en cDNA synthese onderzocht. Daarnaast toont ons onderzoek aan dat het gebruik van referentiegenen voor de normalisatie van RNA expressie data het mogelijk maakt om betrouwbare genexpressie niveaus te meten in patiëntmateriaal met matige RNA degradatie.

Een van de belangrijkste parameters die transplantaatoverleving na niertransplantatie bepaalt, is de gevoeligheid van de patiënt voor steroïden therapie tijdens acute donornier afstoting. Ongeveer 25 tot 30% van de eerste afstoting episodes kan niet worden onderdrukt met enkel steroïden behandeling. In deze gevallen van steroïden resistentie heeft de patiënt een sterkere behandeling met antithymocytenglobuline (ATG)



nodig voor het onderdrukken van de acute resectie episode. Het onvolledig herstel van de donornierfunctie in steroïden resistente resectie kan leiden tot progressie van chronische transplantaatschade en heeft een nadelig effect op transplantatie uitkomst. Voorspelling van steroïden resistentie kan onnodige blootstelling aan hoge dosissen steroïden verminderen en onomkeerbare schade aan nefronen in de donornier, die optreedt tijdens de periode waarin de acute afstoting onderbehandeld wordt met enkel steroïden, voorkomen en de lange-termijn transplantatie uitkomst verbeteren. Voor het identificeren van moleculaire en cellulaire biomarkers, die geassocieerd zijn met steroïden resistentie tijdens acute donornier afstoting, hebben we retrospectieve studies uitgevoerd in een groot cohort van niertransplantatie patiënten met een eerste acute resectie episode (hoofdstukken 3, 4 en 5). Onze studies tonen aan dat steroïden resistentie een complexe en multifactoriële aandoening is, waarbij zowel immunologische en niet-immunologische factoren betrokken zijn. Onderzoek naar immunogelateerde biomarkers demonstreert dat zowel T-cellen en macrofagen een belangrijke rol spelen bij de respons op steroïden therapie. Niertransplantatie patiënten met een steroïden resistente acute resectie episode hebben hogere expressieniveaus van T-cellen met karakteristieke activatie markers vergeleken met patiënten die goed reageren op steroïden behandeling (hoofdstuk 3). Daarnaast blijken macrofagen, afkomstig van de transplantaat ontvanger, een belangrijk component te zijn van het immuun-infiltraat tijdens acute afstoting (hoofdstuk 4). Hierbij correleert het niveau van metallothioneinen (MT)-expresserende macrofagen in het infiltraat met de respons op steroïden behandeling. Verder is er, ondanks aanwijzingen in eerdere studies, geen correlatie gevonden tussen B-cel infiltratie en de respons op steroïden. Gecombineerd toont deze data aan dat steroïden resistentie gevestigd is in specifieke celpopulaties en geen kenmerk is van alle lymfocyten. Deze bevindingen kunnen sturing geven aan de toekomstige therapeutische benaderingen voor de behandeling van steroïden resistente acute donornier afstoting.

Een nieuwe bevinding van ons onderzoek is dat regulatie van zinkionen een belangrijke rol speelt in de reactie op steroïden behandeling (hoofdstuk 4). De response op steroïden therapie tijdens acute donornier afstoting correleert met de expressie van MT-1 familieleden en tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP1), die via hun cysteine rijke molecuulstructuur betrokken zijn bij de regulatie van intracellulaire zinkconcentraties. Verhoogde expressie van deze moleculen kan de beschikbaarheid van zinkionen, vereist tijdens steroïden signalering, verlagen en daarmee de zink-afhankelijke anti-inflammatoire effecten van corticosteroïden verminderen. Niertransplantaat ontvangers, die tijdens acute afstoting hoge niveaus van MT en TIMP1 tot expressie brengen in de donornier, kunnen mogelijk profiteren van extra zink inname voor een optimale GC-signalering. Een tweede niet-immunologische factor, die GC-signalering kan beïnvloeden, is de inductie van metabole veranderingen in de toegediende steroïden therapie (hoofdstuk 5). Expressie van genetische variaties in het metabolisme gen CYP3A5 in de donornier kan de metabole capaciteit van CYP3A5 wijzigen en mogelijk de respons op steroïden therapie tijdens acute donornier resectie verbeteren. Verder demonstren onze bevindingen dat een multivariaat voorspellingsmodel, met biomarkers die gerelateerd zijn aan verschillende aspecten van GC-signalering, de beste prognostische waarde biedt



voor de beoordeling van response op steroïden therapie. Deze multivariate benadering kan worden gebruikt om patiënten te identificeren, die niet reageren op behandeling met steroïden en die kunnen profiteren van directe behandeling met ATG.

Ten slotte demonstreren we dat beoordeling van S100A8 en S100A9 expressie in donornierweefsel klinisch relevant is en gebruikt kan worden voor het inschatten van het risico op een nadelige transplantatie uitkomst (hoofdstuk 6). Screening van de S100 expressieniveaus in de donornier biedt een complementaire aanpak voor het diagnosticeren van acute donornier afstoting en het bepalen of een dergelijke acute rejectie episode na verloop van tijd tot transplantaatverlies leidt. Hoge S100A8 en S100A9 expressie tijdens acute donornier afstoting correleert met betere lange-termijn transplantaatoverleving. De omvang van S100 expressie tijdens acute afstoting biedt daarnaast inzage in de immunologische mechanismen, die betrokken zijn bij de acute rejectie episode. We tonen aan dat hoge expressie van S100 positieve myeloïde cellen in de donornier leidt tot een verhoging in lokale immuunregulatie en een daling van het totale T-cel infiltraat in het transplantaat. Deze verschuiving naar regulering vermindert de intensiteit van de acute ontstekingsreactie gericht tegen de donornier, die op zijn beurt gereflecteerd wordt door een vermindering van donornierschade en gunstige langdurige transplantatie uitkomst. Onze hypothese is dat ontstekingsinfiltraten tijdens acute afstoting, die relatief lage aantallen S100 positieve myeloïde cellen bevatten, minder adequaat opgelost worden en/of voor langere tijd in het transplantaat stand houden. De identificatie van S100A8 en S100A9 als voorspellende markers voor transplantatie uitkomst kan leiden tot betere controle- en interventiestrategieën na niertransplantatie en bijdragen tot een betere lange termijn donornier uitkomst.