



Samenvatting proefschrift Marian C. Roos-van Groningen

'Molecular markers in renal transplant biopsies'

**Promotie: 30 oktober 2008
Universiteit Leiden**

Promotor:
Prof. dr. J.A. Bruijn
Prof. dr. J.W. de Fijter

Co-promotor:
Dr. M. Eikmans

Bij het ontwikkelen van terminaal nierlijden is het van belang om de patiënt nierfunctievervangende therapie te bieden in de vorm van dialyse of een niertransplantatie. Over het algemeen zal circa vijftig procent van alle niertransplantaten binnen 10 jaar na de transplantatie niet meer (voldoende) functioneren. De belangrijkste oorzaak hiervoor is het ontstaan van chronische schade. Chronische schade wordt histologisch gekenmerkt door ophoping van extracellulaire matrixeiwitten tussen de tubuli, ook wel interstitiële fibrose genoemd. Er zijn diverse risicofactoren voor het ontstaan van interstitiële fibrose. Het optreden van een acute afstoting en toxiciteit door het gebruik van calcineurineremmers (afweeronderdrukkende middelen) zijn twee van de belangrijkste risicofactoren voor het ontstaan van interstitiële fibrose. Door het nemen van een nierbiopt, hetzij tijdens een periode van vermindering van nierfunctie zoals voorkomt bij een acute afstotingsepisode, hetzij protocollair doorgaans bij stabiele nierfunctie, kan de mate van (chronische) schade histologisch in kaart worden gebracht. Daarnaast kunnen laboratoriumtechnieken als immunologische kleuringen en mRNA analyses gebruikt worden om moleculaire markers te vinden. Moleculaire markers hebben tenminste vier mogelijke toepassingen in (nier)weefsel. Ten eerste kan het analyseren van moleculaire markers in nierweefsel een diagnostische meerwaarde hebben. Met deze markers kunnen toxiciteit door calcineurineremmer gebruik en chronische schade beter van elkaar worden onderscheiden dan met histologische en klinische parameters. Ten tweede zouden moleculaire markers een bijdrage kunnen leveren aan het monitoren van het effect van therapie, waardoor het ontstaan van weefselschade door toxiciteit kan worden voorkomen. Ten derde kunnen, door het analyseren van mRNA expressie niveaus en het kwantificeren van eiwit deposities, vroege voorspellende markers voor lange termijn prognose worden ontdekt. Gebruik van zulke voorspellende markers kan indirect leiden tot betere



transplantaatoverleving. Ten vierde kunnen nieuwe ziektemechanismen worden ontsluitend en kunnen daardoor nieuwe geneesmiddelen worden ontwikkeld tegen de ziekteveroorzakers waardoor functie van het niertransplantaat behouden blijft. Dit proefschrift richt zich op het identificeren van moleculaire markers in niertransplantaatbiopten om zo de lange termijnoverleving te kunnen voorspellen.

Hoofdstuk 2 is een methodologische studie waarin is gekeken naar het optimaliseren van het extraheren en opslaan van RNA uit het schorsdeel van een nier. Om RNA te extraheren bleek het middel Trizol superieur aan zowel de NP40 methode als RNeasy spin columns. Het RNA dat door middel van Trizol was geëxtraheerd kon tenminste 2 maanden worden opgeslagen bij -70°C zonder vermindering van kwaliteit. Vervolgens toonden we aan dat grotere hoeveelheden cDNA konden worden gemaakt met behulp van AMV reverse transcriptase in vergelijking met Sensiscript RT en Superscript RT. Tijdens het opwerken en de opslag kan RNA afgebroken worden door RNase moleculen. Door het gebruik van het incubatiemiddel RNA/later is het mogelijk weefsels op kamertemperatuur te bewaren zonder dat de kwaliteit van het RNA wordt aangetast. RNA/later tast echter wel de integriteit van de weefsels aan waardoor het vooralsnog niet mogelijk is om dit middel in te voeren in de huidige routinediagnostiek.

De twee calcineurineremmers Cyclosporine A (CsA) en Tacrolimus (Tac) zijn afweeronderdrukkende middelen die voor een groot deel het optreden van een acute afstotingsepisode onderdrukken. Van CsA is bekend dat het een fibrogeen effect kan hebben, dat wil zeggen interstitiële fibrose kan veroorzaken. Voor Tac is dit nog onduidelijk. In hoofdstuk 3 hebben wij het fibrogeen effect van beide middelen op zowel eiwit als mRNA niveau onderzocht in de schors van protocollair verkregen niertransplantaatbiopten van patiënten met systemische blootstelling aan calcineurineremmers. Alle nierbiopten waarin een acute afstotingsreactie werd gediagnosticeerd werden uit de studie gehaald, omdat dit een vertekend beeld zou kunnen geven van de te meten fibrogeen markers. Beide middelen lieten op zowel mRNA- als eiwitniveau een verhoogde expressie van fibrogeen markers zien. Er was tussen de beide middelen echter geen verschil in de mate van expressie van fibrogeen markers. Uit deze resultaten kunnen wij concluderen dat beide middelen in dezelfde mate interstitiële fibrose kunnen veroorzaken in niertransplantaten.

In hoofdstuk 4 is de aandacht gevestigd op prognostische markers in niertransplantaatbiopten met tekenen van een acute afstotingsepisode. Hierin is microarray analyse gebruikt, waarmee genen zijn geïdentificeerd waarvan de expressie tijdens acute afstoting geassocieerd is met het later ontwikkelen van chronische schade binnen vijf jaar na niertransplantatie. Daarna zijn mogelijk voorspellende genen S100A8, S100A9 en surfactant protein-C (SP-C) door middel van individuele mRNA analyse met real-time PCR en door middel van eiwit analyse met immunohistochemie gevalideerd. Ook hebben wij de locatie van de genen door middel van *in situ* hybridisatie kunnen bepalen in nierbiopten om te zien welke cellen de onderzochte genen tot expressie brengen. De markers S100A8 en S100A9 kleuren tevens een subset van aanwezig interstitieel infiltraat aan. Dit wijst mogelijk op een gunstig effect van infiltraatcellen op de transplantaatoverleving. Door een combinatie van de gevonden



markers in niertransplantaatbiopten met een acute afstoting te meten op mRNA- en eiwitniveau, zou het mogelijk moeten zijn om het ontstaan van progressief nierfalen beter te voorspellen. In toekomstig onderzoek zal dit nader gevalideerd moeten worden in grotere patiëntgroepen.

(Myo)fibroblasten zijn cellen die verhoogde extracellulaire matrix depositie kunnen bewerkstelligen. Zoals eerder is beschreven ontstaat interstitiële fibrose door de ophoping van matrix. De herkomst van de in de nier aanwezige (myo)fibroblasten is niet geheel duidelijk. Naast werving uit het beenmerg, kunnen zij lokaal prolifereren in de nier. Ook is beschreven dat een tubulus-epitheelcel zich kan transformeren tot een (myo)fibroblast, in het Engels 'epithelial to mesenchymal transition' (EMT) genoemd. In hoofdstuk vijf wordt onderzoek beschreven waarin een dubbelkleuring voor epitheliale cellen en (myo)fibroblasten laat zien dat er cellen zijn die beide fenotypes kunnen hebben. Uit het werk dat in dit hoofdstuk en in hoofdstuk zes wordt beschreven concluderen wij dat correlatieve onderzoek geen dominante rol aantoont voor de door ons onderzochte EMT-gerelateerde eiwitten in de ontwikkeling van chronische schade in niertransplantaten. Dit zou kunnen betekenen dat EMT, in tegenstelling tot wat algemeen wordt aangenomen, geen belangrijke rol speelt bij het ontstaan van chronische schade, of dat andere EMT-gerelateerde eiwitten moeten worden onderzocht. ◀