



Samenvatting proefschrift Simone A. Joosten

'Pathobiology of chronic renal allograft rejection: tissue specific humoral immune responses and accelerated ageing'

**Promotie 2 juni 2004
Universiteit Leiden**

**Promotoren: Prof. dr. L.C. Paul
Prof. dr. M.R. Daha**
Co-promotor: Dr. C. van Kooten

Jaarlijks worden in Nederland enkele honderden niertransplantaties verricht bij patiënten die door verschillende oorzaken onvoldoende nierfunctie hebben. Helaas wordt in een deel van de patiënten deze nieuwe nier afgestoten door het immuunsysteem. In het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC) wordt onderzoek gedaan naar afstoting van niertransplantaten en in het bijzonder naar oorzaken van chronische afstoting.

Chronische afstoting is een van de belangrijkste oorzaken van het verloren gaan van niertransplantaten na het eerste jaar na transplantatie. Afwijkingen die bij chronische afstoting horen kunnen voorkomen vanaf ongeveer 6 maanden na transplantatie. Chronische afstoting wordt klinisch gekenmerkt door een geleidelijke achteruitgang van de nierfunctie en de aanwezigheid van eiwit in de urine (proteïnurie). De mechanismen achter het ontstaan van chronische afstoting zijn nog onbekend. Wel is een groot aantal risicofactoren hiervoor geïdentificeerd. Deze risicofactoren wijzen op een rol voor het immuunsysteem in de pathogenese van chronische afstoting. Immunoreacties tegen HLA antigenen lijken dan het meest voor de hand te liggen, maar eerder onderzoek heeft aangetoond dat lang niet alle patiënten met chronische afstoting anti-HLA antistoffen hebben. In bipten van deze patiënten zijn wel neerslagen van complement factor C4d gevonden, een kenmerk van antistof-gemedieerde afstoting. Daarom is in dit proefschrift gekeken naar antistoffen gericht tegen niet-HLA eiwitten (als mogelijke antigenen) die aanwezig zijn in de nier en mogelijk herkend worden door het immuunsysteem.



In nieren met chronische afstoting zijn in ongeveer 15% van de patiënten, afwijkingen in de glomeruli te vinden die horen bij transplantaat glomerulopathie (TGP). Deze afwijkingen bestaan uit een splitsing van de glomerulaire basaal membraan (GBM), de filtratie membraan van de nier. Schade aan de GBM, bijvoorbeeld door antistof binding, kan leiden tot proteïnurie. Veranderingen in de GBM worden vaak gevonden in chronische afstoting. Aangezien dit het gevolg zou kunnen zijn van een immuunreactie tegen de GBM, zijn GBM componenten goede kandidaat antigenen. Om de mechanismen van chronische afstoting te bestuderen wordt vaak gebruik gemaakt van een proefdiermodel. In dit model wordt een Fischer (F344) nier in een Lewis (LEW) ontvanger rat geplaatst, waarna eerst een acute afstoting optreedt die daarna overgaat in chronische afstoting. De typische kenmerken van chronische afstoting zoals splitsing van de GBM zijn ook in dit model aanwezig.

In het F344 naar LEW model zijn antistoffen gevonden die de donor GBM herkennen. Antistoffen werden alleen gevonden in ratten met chronische afstoting en niet in ratten zonder afstoting. De antistoffen zijn niet aanwezig voor transplantatie, maar konden in het serum aangetoond worden vanaf 3 weken na transplantatie. Ook in de nieren van deze ratten werden antistoffen gevonden die na elutie ('losweking') GBM herkenden in een ELISA. Proteomics technieken hebben uiteindelijk geleid tot de identificatie van perlecan (een heparan sulfaat proteoglycaan) als een van de antigenen.

Bij histopathologisch onderzoek van nieren met chronische afstoting bleken ook antistoffen aanwezig te zijn in het mesangium. Vandaar dat ook de aanwezigheid van circulerende antistoffen gericht tegen mesangium cellen onderzocht is. Opnieuw bleken de antistoffen alleen aanwezig te zijn in ratten met chronische afstoting, maar niet in ratten zonder afstoting, en waren de antistoffen detecteerbaar vanaf 3 weken na transplantatie. De aanwezigheid van antistoffen gericht tegen de GBM en tegen mesangium cellen bleken goed met elkaar te correleren. Remming van de GBM binding van deze antistoffen door pre-incubatie met mesangium cellen suggereert dat bepaalde antigenen, die herkend worden door deze antistoffen, zowel in de GBM als op mesangium cellen voor komen. Naast binding van antistoffen in de glomeruli werden ook antistoffen op de tubulaire basaal membraan (TBM) gevonden. Ook werden veel-kernige reuscellen gevonden tussen de tubuli van ratten met chronische afstoting. Deze reuscellen zijn kenmerkend voor een granulomateuze ontsteking.



Chronische afstoting met de kenmerkende glomerulaire afwijkingen komt niet alleen voor in proefdiermodellen maar ook in patiënten die een niertransplantaat ontvangen hebben. De bevindingen in het proefdiermodel hebben er toe geleid dat in patiënten met TGP de risicofactoren voor chronische afstoting, alsmede antistof reacties, bestudeerd zijn. Risicofactor analyse van deze subgroep van patiënten met chronische afstoting liet zien dat met name de aanwezigheid van antistoffen voor transplantatie en het optreden van late acute afstoting belangrijk zijn. Vanwege deze immunologische risicofactoren is een C4d kleuring als marker van antistof-gemedieerde afstoting verricht op biopten met TGP. Glomerulaire deposities van C4d werden in bijna alle patiënten aangetroffen. Combinatie van deze bevindingen met de antistoffen die in het experimentele model gevonden zijn heeft geleid tot het gericht zoeken naar antistoffen in patiënten met TGP. Net als ratten met chronische afstoting blijken TGP patiënten antistoffen te hebben die binden aan gezuiverde GBM heparan sulfaat proteoglycanen. Kleuring van normale niercoupes met deze antistoffen liet een GBM patroon zien, wat gelijk was aan het patroon van de heparan sulfaat proteoglycanen perlecan en agrine. Verdere zuivering met behulp van antilichamen van een patiënt en karakterisatie met behulp van bekende antistoffen heeft laten zien dat agrine in elk geval een van de antigenen is dat door een aanzienlijk deel van de TGP patiënten herkend wordt.

Naast de specifieke glomerulaire en vasculaire afwijkingen van chronische afstoting zijn ook minder specifieke afwijkingen aanwezig in biopten met chronische afstoting. Deze afwijkingen in het tubulo-interstitiële gebied zijn vergelijkbaar met de afwijkingen die ook in een nierbiopt van een persoon op leeftijd gevonden kunnen worden. Mogelijk speelt versnelde veroudering een rol bij het ontstaan van deze lesies. Daarom zijn in het model voor chronische afstoting parameters van cellulaire veroudering, senescence, eveneens bestudeerd. Al tijdens de transplantatie procedure zorgen ischemie en reperfusie schade ervoor dat de uiteinden van de chromosomen, telomeren, dramatisch verkort raken. Deze verkorting van de telomeren is onafhankelijk van welke transplantatie werd uitgevoerd (F344 naar LEW, LEW naar F344 of syngene) en leidt tot activatie van de cel cyclus regulatoren p21 en p16. De expressie van het senescence-specifieke eiwit, SA β -gal, bleek wel specifiek voor nieren met chronische afstoting. Dit bevestigt dat versnelde veroudering optreedt tijdens chronische afstoting in dit model.

Hoewel acute transplantaat afstoting tegenwoordig goed te behandelen is, blijft chronische afstoting een lastig behandelbaar en weinig begrepen probleem.



In dit proefschrift wordt aangetoond dat antistoffen gericht tegen weefsel-specifieke, niet HLA-antigenen aanwezig zijn tijdens chronische afstoting in zowel patiënten met transplantaat glomerulopathie als in experimentele modellen. Nader onderzoek is nodig om de rol van deze antistoffen in het ontstaan van de glomerulaire afwijkingen aan te tonen en te testen of deze antistoffen specifiek zijn voor chronische afstoting. Als blijkt dat deze antistoffen een cruciale rol spelen in chronische afstoting opent dit mogelijkheden voor het ontwikkelen van nieuwe, meer gerichte therapieën zoals het blokkeren van B cel activatie.