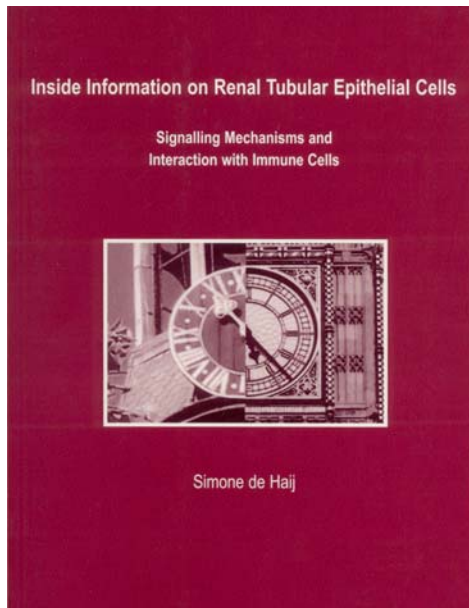


De publicatie van dit proefschrift werd in 2004 gesponsord met een bijdrage van de Nederlandse Transplantatie Vereniging.
Tijdens de wetenschappelijke voorjaarsvergadering van de NTV in 2006 ontving Mevr. De Haij voor haar proefschrift de Jon J. van Roodprijs voor preklinisch onderzoek.



Samenvatting proefschrift Simone de Haij

'Inside Information on Renal Tubular Epithelial Cells. Signalling Mechanisms and Interaction with Immune Cells'

**Promotie 3 maart 2004
Universiteit Leiden**

**Promotor: Prof. dr. M.R. Daha
Co-promotor: Dr. C. van Kooten**

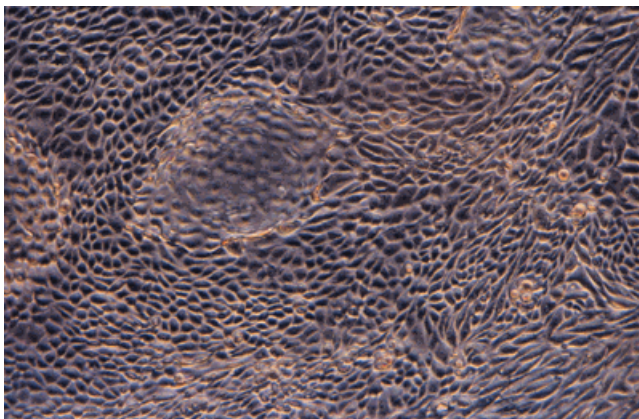
Niertransplantatie en tubulus epitheelcellen

Patiënten met nierfalen zijn aangewezen op dialyse om de functie van de nier over te nemen en het lichaam te ontdoen van afvalstoffen. Dialysepatiënten zijn in hoge mate beperkt in hun manier van leven en de mortaliteit onder deze patiënten is hoog. De beste manier om de functie van de nier over te nemen is niertransplantatie. Sinds de introductie van immunosuppressiva zoals cyclosporine is de 1 jaars overleving van niertransplantaten gestegen tot ongeveer 90%. Echter, op de lange termijn gaan nog steeds veel transplantatienieren verloren door een chronische ontsteking. Bovendien hebben de immunosuppressiva veel bijwerkingen, zoals verhoogde gevoeligheid voor infecties en het ontstaan van kanker. Daarom wordt veel onderzoek gedaan naar alternatieven om afstoting te voorkomen en acceptatie van de donornier op lange termijn te bewerkstelligen.

Ook al valt een afstotingsreactie meestal goed te behandelen met afweeronderdrukkende medicijnen, toch is bekend dat het aantal afstotingsreacties dat iemand doormaakt in belangrijke mate bepaalt hoe de nier op langere termijn zal functioneren. Een afstotingsreactie wordt gekenmerkt door infiltrerende T cellen en macrofagen in het tubulo-interstitium. Het belangrijkste doelwit van deze cellen zijn de tubulus epitheelcellen, kortweg TEC, die de wanden van de verzamelbuizen bekleden. Infiltrerende afweercellen kunnen op verschillende manieren schade toebrengen aan TEC, waardoor de nierfunctie achteruitgaat. Ook in de Banff classificatie is aanwezigheid van tubulitis een van de belangrijkste diagnostische criteria voor acute afstoting.



Onderzoek heeft aangetoond dat tubulus epitheelcellen niet alleen een onschuldig doelwit zijn van afweercellen, maar ook een actieve bijdrage kunnen leveren aan het ontstekingsproces. Wanneer tubulusepitheelcellen geactiveerd raken, kunnen ze ontstekingsfactoren aanmaken, chemokinen genaamd, die afweercellen kunnen aantrekken vanuit de bloedbaan naar de donornier en daarmee de afstotingsreactie kunnen verergeren. Doel van dit promotieonderzoek was meer te weten te komen over de manier waarop tubulus epitheelcellen geactiveerd raken, de mechanismen in de cel die hierbij betrokken zijn en de interactie tussen TEC en afweercellen om hierdoor meer inzicht te krijgen in de rol van tubulus epitheelcellen in het afstotingsproces. Voor dit onderzoek hebben we gebruik gemaakt van tubulus epitheelcellen die gekweekt werden uit nierbiopten die vlak voor transplantatie werden afgenomen of uit nieren die om technische redenen niet geschikt bleken te zijn voor transplantatie (Figuur 1).



Figuur 1: Tubulus epitheelcellen worden gekweekt uit nierbiopten die vlak voor transplantatie werden afgenomen of uit nieren die niet geschikt bleken te zijn voor transplantatie. De cellen groeien als een monolaag in een gepolariseerde vorm en zullen door het behoud van hun transportcapaciteit gedeeltelijk los komen en zogenaamde 'domes' vormen (uit focus op de foto).

Activatie van tubulus epitheelcellen

Vanuit de literatuur is bekend dat schade die optreedt tijdens de transplantatieprocedure al voldoende is om TEC te activeren, zodat ze chemokinen gaan aanmaken. Wij hebben laten zien dat ook factoren die gemaakt worden door infiltrerende afweercellen, in dit geval T-cellen, in sterke mate bijdragen aan de activatie van TEC. Dit kunnen oplosbare moleculen zijn, zoals interleukine-17 (IL-17), of celopper-



vlaktemoleculen, zoals CD40L.

Combinatie van CD40L en IL-17 resulteerde zelfs in nog sterkere activatie, gemeten aan de hoeveelheid chemokinen die door de TEC werden geproduceerd. Op deze manier kan een vicieuze cirkel ontstaan van T-cellen die TEC activeren, wat leidt tot hogere chemokine productie, waardoor weer meer afweercellen worden aangetrokken, enzovoort. Interactie tussen afweercellen en TEC kan dus in belangrijke mate bijdragen aan het afstotingsproces.

Een andere factor die door T-cellen wordt gemaakt is interleukine-4 (IL-4). In eerste instantie werd IL-4 gezien als een ontstekingsremmende factor. Aanwezigheid van IL-4 zou de afstotingsreactie dus kunnen verminderen. Wij hebben echter aangetoond dat combinatie van IL-4 en CD40L juist tot sterke activatie van TEC leidt. Inmiddels is bekend dat IL-4 niet afstoting tegengaat, maar mogelijk een ander soort afstotingsreactie kan veroorzaken, waar een ander type witte bloedcel bij betrokken is (de eosinofiel). Onze resultaten wijzen erop dat deze alternatieve vorm van afstoting mogelijk een belangrijkere rol zou kunnen spelen dan tot nu toe werd aangenomen. Een belangrijke kanttekening is wel dat ons onderzoek zich heeft beperkt tot gekweekte cellen. Meer onderzoek is nodig om aan te tonen wat het belang van deze resultaten is voor de afstotingsreactie in het lichaam van de transplantatiepatient.

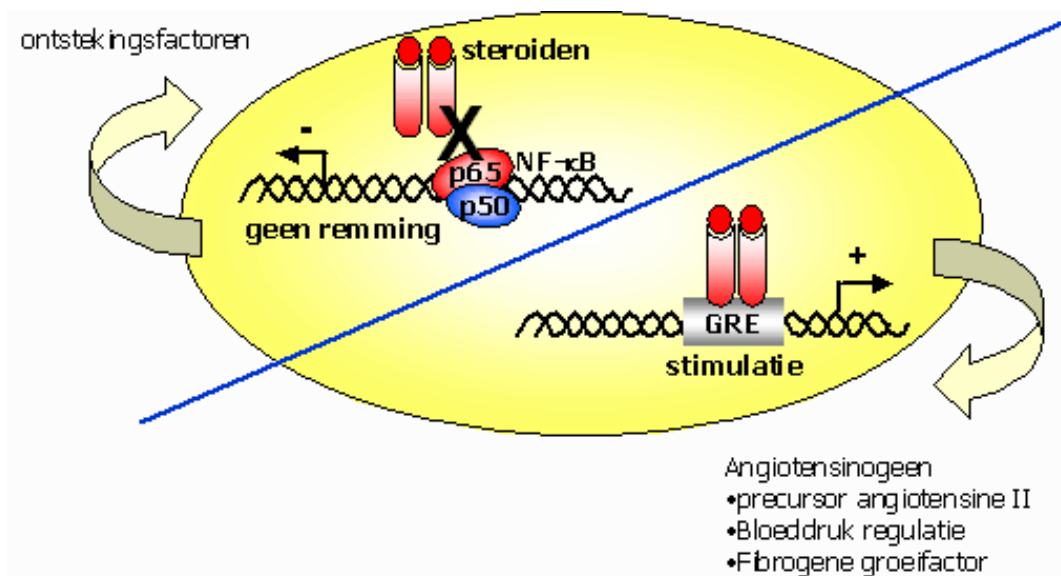
Mechanismen van TEC activatie

In het vervolg van het promotieonderzoek hebben we onderzocht welke signalen in de tubulus epitheelcel betrokken zijn bij de productie van ontstekingsfactoren. Deze signalen zouden mogelijk kunnen dienen als aangrijpingspunt voor een nieuwe therapie. Door het blokkeren van de signaleringsroutes zou de productie van chemokinen kunnen worden stilgelegd, wat de vicieuze cirkel in het aantrekken van afweercellen zou kunnen doorbreken. We hebben aangetoond dat de transcriptiefactor NF- κ B een cruciale rol speelt. Deze factor regelt de productie van ontelbare chemokinen en andere ontstekingsfactoren. Doordat deze factor zo belangrijk is, grijpen veel van de bekende immuunonderdrukkende medicijnen hierop aan. Een van deze medicijnen is dexamethason. Tot onze grote verrassing vonden we dat dexamethason niet in staat was om de productie van ontstekingsfactoren door tubulus epitheelcellen te onderdrukken, terwijl dexamethason zeer effectief werkte op andere epitheelcellen, afkomstig uit long, en op een ander type niercellen, de nierfibroblasten. Zoals gezegd, grijpt dexamethason aan op de NF- κ B signaleringsroute. Er zijn vele manieren beschreven waarop dit zou kunnen plaatsvinden, maar wij hebben aangetoond dat geen van deze mechanismen werkzaam is in tubulus epitheelcellen. Remming van ontstekingsfactoren is een belangrijke reden voor het gebruik van steroïden zoals prednison als onderhoudsmedicatie na transplantatie en als extra



behandeling tijdens afstoting.

Onze resultaten wijzen erop dat hoewel steroïden goed in staat zijn de afweercellen te onderdrukken, het effect op tubulus epitheelcellen minimaal is. Dit zou kunnen betekenen dat in aanwezigheid van steroïden continu een bepaalde mate van ontsteking in de nier aanwezig zou kunnen blijven die bij zou kunnen dragen aan chronische ontsteking en transplantaatverlies. Bovendien hebben we aanwijzingen dat steroïden wel de productie van angiotensinogeen kunnen stimuleren en daarmee bijdragen aan een verhoogde bindweefsel productie. Dit kan mogelijk leiden tot een versnelde littekenvorming in het weefsel, waardoor de nierfunctie wordt belemmerd. Prednison lijkt op TEC dus geen ontstekingsremmend effect te hebben, terwijl wel sprake is van bijwerkingen die zijn geassocieerd met de stimulatie van genexpressie, zoals schematisch weergegeven in figuur 2. Al met al dus een extra reden om naar alternatieven voor prednison te zoeken.



Figuur 2: Steroïden kunnen de productie van ontstekingsfactoren door nierepitheelcellen niet remmen, omdat ze niet in staat zijn de transcriptiefactor NF-κB te blokkeren. Steroïden stimuleren echter wel de productie van profibrotische factoren zoals angiotensinogeen.

*De publicatie van dit proefschrift werd in 2004 gesponsord met een bijdrage van de Nederlandse Transplantatie Vereniging.
Tijdens de wetenschappelijke voorjaarsvergadering van de NTV in 2006 ontving Mevr. De Haij voor haar proefschrift de Jon J. van Roodprijs voor preklinisch onderzoek.*



De centrale rol voor NF- κ B duidt erop dat deze transcriptiefactor een goede kandidaat zou zijn voor nieuwe therapie. Belangrijk hiervoor is dat de remming specifiek is en zo mogelijk voor een beperkte tijd, aangezien deze factor ook van belang is voor de afweer tegen infecties.

In ons onderzoek ontdekten we een nieuw mechanisme in de regulatie van NF- κ B via het c-jun N-terminal kinase dat mogelijk een goed aangrijpingspunt zou zijn voor specifieke remming van NF- κ B tijdens ontsteking. De volgende stap is te bepalen of dit haalbaar is in een diermodel voor transplantatie. In de literatuur zijn inmiddels studies verschenen waarbij in een ratmodel de nier werd voorbehandeld met een specifieke NF- κ B remmer alvorens de nier te transplanteren. Deze nieren functioneerden beter en bevatten minder infiltrerende afweercellen. Er zijn hiermee nog geen studies gedaan in mensen.

Interactie tussen TEC en infiltrerende cellen

Naast de productie van chemokinen om afweercellen aan te trekken vanuit de bloedbaan, brengen tubulus epitheelcellen nog een groot aantal andere factoren tot expressie die invloed zouden kunnen hebben op de functie van de afweercel. Om een goed beeld te kunnen krijgen van de ontstekingscapaciteit van TEC, hebben we een array-experiment uitgevoerd, waarin werd gekeken naar het effect van CD40L stimulatie op de expressie van meer dan 8500 genen. Op basis van deze 8500 genen kon een profiel worden vastgesteld dat kenmerkend is voor een geactiveerde tubulus. De diagnose afstoting wordt op dit moment gesteld op basis van een nierbiopt dat onder de microscoop wordt beoordeeld. Dit geeft meestal slechts beperkte informatie over de prognose van de patient. Het is de verwachting dat in de toekomst de biopten met vergelijkbare arrays zullen worden geanalyseerd. Op basis van deze analyses, die op dit moment al op kleine schaal worden uitgevoerd, zijn we wellicht in staat om het profiel van geactiveerde tubuli te herkennen en te correleren aan het type afstoting en mogelijk te gebruiken als voorspeller van nierfunctie op langere termijn. Uit de array analyse is in ieder geval gebleken dat geactiveerde TEC een enorme variëteit aan eiwitten tot expressie brengen, waaronder ook eiwitten die tot nu toe nauwelijks zijn onderzocht en die nieuwe aanknopingspunten bieden voor verder onderzoek.

Het is al lange tijd een punt van discussie of tubulus epitheelcellen in staat zijn om T-cellen, de belangrijkste veroorzakers van schade, te activeren of juist niet. Om T-cellen te activeren zijn 2 signalen nodig, signaal 1 via het HLA en signaal 2 via costimulatoire moleculen. De bekendste costimulatoire moleculen zijn B7.1 en B7.2. Zelfs het feit of deze moleculen tot expressie komen op tubulus epitheelcellen is controversieel, wij hebben ze in ieder geval niet kunnen aantonen. Dit zou betekenen dat TEC geen T cel activatie kunnen geven door het ontbreken van signaal 2. Recent zijn echter nieuwe costimulatoire moleculen ontdekt die lijken op de klassieke B7.1 en B7.2 moleculen,

5

*De publicatie van dit proefschrift werd in 2004 gesponsord met een bijdrage van de Nederlandse Transplantatie Vereniging.
Tijdens de wetenschappelijke voorjaarsvergadering van de NTV in 2006 ontving Mevr. De Haij voor haar proefschrift de Jon J. van Roodprijs voor preklinisch onderzoek.*



behalve dan dat ze op veel meer cellen tot expressie komen. We hebben laten zien dat twee van deze nieuwe moleculen, ICOS-L en B7-H1, wel voorkomen op TEC. Bovendien hebben we gevonden dat tubulus epitheelcellen de T-cellen zodanig kunnen moduleren dat ze meer van de beschermende factor IL-10 gaan maken en tegelijkertijd minder van de schadelijke factor IFN-g.

Dit is een belangrijke bevinding, die om verder onderzoek vraagt, omdat dit zou kunnen betekenen dat interactie van tubulus epitheelcellen met T-cellen juist een gunstig effect op de acceptatie van het donororgaan zou kunnen hebben.

Conclusies

In dit proefschrift hebben we op meerdere manieren onderzocht wat de rol is van tubulus epitheelcellen in het afstotingsproces dat kan optreden na een niertransplantatie en dat een belangrijke voorspeller is van de transplantatoverleving op lange termijn. Uit onze resultaten is gebleken dat tubulus epitheelcellen een dubbele rol kunnen spelen in het ontstekingsproces. Aan de ene kant produceren geactiveerde TEC ontstekingsfactoren die aanleiding geven tot het aantrekken van afweercellen, die schade veroorzaken aan de donornier. Interactie met infiltrerende cellen speelt een belangrijke rol in de regulatie van TEC activatie, hetgeen kan leiden tot een vicieuze cirkel in het afstotingsproces. In tegenstelling tot de huidige afweeronderdrukkende medicijnen zoals prednison, kan een specifieke remmer van de transcriptiefactor NF- κ B een nieuwe mogelijkheid bieden tot het onderbreken van deze cirkel. Aan de andere kant kunnen tubulus epitheelcellen de T-cel respons ombuigen naar een meer beschermende functie en daarmee mogelijk een rol spelen in de acceptatie van het donororgaan. Het totaal aan signalen dat betrokken is bij de interactie tussen T-cellen en nierepitheel cellen alsook andere celtypen in de nier zal uiteindelijk bepalen hoe sterk de afweerreactie is die tegen het donororgaan ontstaat. Verder onderzoek is nodig om een beter inzicht te verkrijgen in de onderlinge communicatie tussen deze cellen en de mogelijkheden om deze interacties zodanig te sturen dat dit uiteindelijk zal leiden tot langdurige transplantatoverleving met betere kwaliteit van leven voor de patiënt.