

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22185> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Pol, Pieter van der

**Title:** Pathogenic role of complement in renal ischemia/reperfusion injury

**Issue Date:** 2013-11-12

CHAPTER

# 10

**Nederlandse samenvatting**  
**List of abbreviations**  
**Curriculum vitae**  
**Bibliography**

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

### Ischemie/reperfusie schade

Tussen de uitname en transplantatie van een donornier is er geen doorbloeding van het orgaan. Hierdoor ontstaat een tekort aan zuurstof, glucose en andere voedingsstoffen en een opstapeling van afvalstoffen zoals koolstofdioxide in de nier. Deze toestand in het orgaan wordt ischemie genoemd. Door het tekort aan zuurstof tijdens ischemie kan de nier geen energie produceren en ontstaat er weefselschade die te vergelijken is met bijvoorbeeld een hersen- of hartinfarct. Alle levensprocessen zoals bewegen, maar ook bijvoorbeeld het stabiel en gezond houden van onze cellen, kosten energie. Deze energie wordt verkregen door de verbranding van suikers en vetten waarbij ook zuurstof benodigd is. Iedere cel in ons lichaam bevat een soort energiefabriekjes, mitochondriën genaamd, waarin met behulp van zuurstof, suikers en vetten verbrand worden. De energie die daaruit vrijkomt, wordt opgeslagen in de chemische vorm van adenosine trifosfaat (ATP). ATP is dus de chemische drager van energie in al onze cellen. We kunnen ATP vergelijken met de stroom die wordt opgewekt in een elektriciteitscentrale wanneer kolen en gas (net zoals suikers en vetten in onze cellen) verbrand worden. Zonder ATP in onze cellen kunnen wij niet leven. Tijdens de ischemie is er niet genoeg zuurstof en brandstof om ATP te produceren en ontstaat er weefselschade in de nier. We noemen deze schade ischemieschade. Het herstellen van de bloedtoevoer na een niertransplantatie wordt reperfusie genoemd. Bij de reperfusie van een ischemisch orgaan worden schadelijke afvalstoffen afgevoerd en zuurstof, glucose en andere belangrijke stoffen aangevoerd die nodig zijn om het weefsel te herstellen. Het lijkt tegenstrijdig, maar het is bekend dat de reperfusie van een ischemisch orgaan echter tot nog veel meer weefselschade leidt. De schade na de reperfusie noemen we daarom ischemie/reperfusie schade (I/R schade).

Het is aangetoond dat I/R schade kort na de transplantatie een erg ongunstige invloed heeft op de functie van de nier op de lange termijn. Het is daarom dus erg belangrijk om deze I/R schade als gevolg van de onderbroken bloedtoevoer tijdens de niertransplantatie te voorkomen of zoveel mogelijk te beperken. Hierover gaat het onderzoek beschreven in dit proefschrift.

De oorzaak van I/R schade is nog onvoldoende duidelijk en er is daarom op dit moment nog geen gerichte behandeling ontwikkeld om I/R schade te beperken. Bij het ontstaan van I/R schade speelt ons aangeboren afweersysteem een rol. Het complementsysteem waarover dit proefschrift vooral gaat, is een onderdeel hiervan. Dit complementsysteem doodt indringende bacteriën via een serie activerende factoren in het bloed. Voordat hierop dieper ingegaan zal worden, is enige uitleg van het immuunsysteem en de fysiologie van de nier nodig.

## Fysiologie van de nier

Om ons bloed te filteren, bevatten onze nieren ongeveer 1 miljoen nierfiltertjes (glomeruli) waar het bloed doorheen stroomt. De glomerulus is een soort klein vergietje van 0,2 mm grootte dat kleine eiwitten, zouten, water en afvalstoffen uit het bloed doorlaat. Grote eiwitten en cellen passen echter niet door de gaatjes en verlaten de glomerulus weer via een afvoerend bloedvat. Het filtraat dat uit de glomerulus komt, wordt opgevangen in een nierbuisje (tubulus). Deze nierbuisjes (tubuli), waarvan er dus ook 1 miljoen zijn omdat ze verbonden zijn met de glomeruli, monden uit in het nierbekken waar de urine verzameld wordt voordat het naar de blaas toestroomt.

In deze tubuli vindt een ontzettend belangrijk proces plaats, dat we tubulaire reabsorptie noemen. Dagelijks wordt door de nieren namelijk 180 liter filtraat (voorurine) geproduceerd, waarvan slechts 1-2 liter wordt uitgescheiden als urine. De voorurine, die belangrijke eiwitten, zouten en suikers bevat, wordt grotendeels weer opgenomen in het bloed via een laagje cellen dat zich aan de binnenkant van de tubuli bevindt. We noemen deze cellen tubulus epitheelcellen en het proces van opname heet dus tubulaire reabsorptie. Zonder dit proces zouden we binnen enkele minuten al onze eiwitten, water, zouten en suikers uit ons bloed verliezen. Het proces van tubulaire reabsorptie kost erg veel energie (ATP). Daarom bevatten de tubulus epitheelcellen veel mitochondriën en gebruiken ze veel zuurstof uit het bloed. Om de opgenomen stoffen terug te transporteren naar het bloed, zitten er veel kleine bloedvaatjes om de tubuli heen. Deze bloedvaatjes nemen de belangrijke stoffen via de tubulus epitheelcellen uit de urine weer op in bloed. Een nadeel hiervan is dat ook veel zuurstof dat eigenlijk bestemd is voor de tubulus epitheelcellen, weer opgenomen wordt in het bloed, terwijl de zuurstofbehoefte in de epitheelcellen juist groot is. Normaal gesproken is dit precies in balans. Echter bij een niertransplantatie, wanneer de bloed- en zuurstoftoevoer stopt, gaat het mis. De tubulus epitheelcellen die veel zuurstof nodig hebben om ATP te maken voor tubulaire reabsorptie, raken gestrest en gaan dood wanneer de bloedtoevoer te lang stopt. We noemen dit acute tubulus necrose (ATN). Bij ATN als gevolg van een ATP-tekort raken de tubulus cellen los van de tubuluswand waar ze op groeien en komen in de holte (lumen) van de nierbuisjes terecht. Hier gaan de cellen dood (necrose) en vallen uit elkaar in kleine deeltjes. Samen met gefilterde eiwitten vormen deze deeltjes grote klompen celmateriaal (casts), waardoor de nierbuisjes verstopt raken en de nierfunctie stopt. Vooral bij nieren die afkomstig zijn van overleden donoren en dus een lange ischemietijd hebben, is de tubulus necrose en I/R-schade groot. Het duurt daarom ook vaak enkele dagen voordat deze getransplanteerde nieren weer enigszins functioneren. In deze dagen is de patiënt aangewezen op nierdialyse.

## Het complementsysteem

De belangrijkste functies van ons afweer- of immuunsysteem is om ons te beschermen tegen ziekteverwekkers (pathogenen) zoals bacteriën en virussen. De afweercellen in ons bloed die hierbij betrokken zijn, noemen we witte bloedcellen (leukocyten). Deze cellen worden geholpen door een groep eiwitten (proteïnen) in ons bloed die ook deel uit maken van ons afweersysteem. Eiwitten zijn biologische moleculen en zijn essentieel voor organismen. Ze bestaan uit lange ketens van aminozuren. Eiwitten hebben heel veel verschillende functies. In onze cellen zijn ze betrokken bij chemische omzettingen (enzymen), het in stand houden van de structuur van cellen (cytoskelet), transport van stoffen in, uit en binnenin de cel en voor communicatie tussen cellen (bijvoorbeeld hormonen).

In ons bloed bevindt zich een groep eiwitten die naast de witte bloedcellen betrokken is bij ons immuunsysteem. Deze eiwitten heten complementfactoren en samen vormen deze complementfactoren het zogenaamde complementsysteem. Het complementsysteem speelt samen met de witte bloedcellen en antistoffen (ook een groep eiwitten) een zeer belangrijke rol bij de afweer tegen ziekteverwekkers. Het complementsysteem is een systeem van factoren in het bloed dat verantwoordelijk is voor het lek maken (lyseren) van met antilichamen bedekte bacteriën en virussen. Deze complementfactoren maken samen gaatjes (poriën) in de wand van de bacterie waardoor deze lyseert en dood gaat.

Onder normale omstandigheden verkeert het complementsysteem in een niet-geactiveerde staat. Activatie en daarmee het ontstaan van biologische activiteit kunnen plaatsvinden na interactie van complementfactoren met bijvoorbeeld antistoffen die gebonden zijn aan een bacterie of rechtstreeks met allerlei bacteriën en virussen zonder tussenkomst van antilichamen.

Het complementsysteem werkt direct vanaf de geboorte en hoeft daarom niet geleerd te worden hoe om te gaan met ziekteverwekkers. Het maakt daarom deel uit van het zogenaamde aangeboren (innate) immuunsysteem. Wanneer een ziekteverwekker zoals een bacterie ons lichaam binnendringt, wordt het allereerst aangevallen door het complementsysteem. Het complementsysteem werkt als een soort kettingreactie. Er zijn allereerst enkele eiwitten in het complementsysteem die de ziekteverwekkers herkennen en hieraan binden. Eén van deze “herkende” complementfactoren, waar dit promotieonderzoek ook overgaat, is Mannan-binding lectin (MBL). Deze complementfactor herkent bepaalde suikermoleculen (mannan en mannose) die voorkomen op ziekteverwekkers, maar ook op onze eigen cellen wanneer deze dood gaan. Wanneer MBL bindt aan een dergelijk suikermolecuul op bijvoorbeeld een bacterie, verandert de vorm van het MBL-eiwit en wordt het actief. Vervolgens ontstaat een kettingreactie waarbij verschillende complementfactoren elkaar

activeren en gebonden worden op het oppervlak van de ziekteverwekker. We noemen dit de lectine route activatie van het complementsysteem. Andere “herkende” complementfactoren zijn C1q en properdine. Deze complementfactoren activeren weer een andere route of kettingreactie van het complementsysteem, namelijk de klassieke route door C1q en de alternatieve route door properdine. Uiteindelijk komen alle drie de routes uit bij het centrale molecuul van het complementsysteem, namelijk complement factor C3.

Activatie van C3 leidt tot splitsing van het C3 molecuul in C3a en C3b. Het C3b wordt stevig (covalent) gebonden op het oppervlak van de bacterie. Activatie van het complementsysteem leidt dus altijd tot een laagje C3b dat de ziekteverwekker als het ware bedekt. Op deze manier vormt het complementsysteem een soort C3b vlaggetjes op de ziekteverwekker, waardoor deze als het ware gemarkeerd (geopsoniseerd) wordt om opgeruimd te worden. De witte bloedcellen hebben een soort antennes (receptoren) op hun oppervlak die de C3b vlaggetjes herkennen en de gemarkeerde bacterie vervolgens kunnen opeten (fagocyteren).

Daarnaast kunnen andere complementfactoren (C5, C6, C7, C8, C9) ook op volgorde geactiveerd raken via C3b. Hierbij wordt eerst het C5 molecuul gesplitst in C5a en C5b. Vervolgens binden de factoren C6-C9 aan het gesplitste C5b en maken samen een gaatje (porie) in de bacterie, waarna deze lyseert. Het C5b-C9 complex wordt daarom ook wel het Membrane-Attack-Complex (MAC) genoemd. Activatie van C5 tot C9 wordt de terminale route van het complementsysteem genoemd.

Naast het opsoniseren met C3b (waardoor de ziekteverwekker gemarkeerd wordt voor opruiming) en het lyseren door het C5b-9 complex (waardoor de ziekteverwekker lek raakt), heeft het complementsysteem nog een derde functie. Bij de splitsing van C3 en C5 worden de splitsingsfactoren C3a en C5a gevormd. Deze factoren worden ook wel anaphylatoxines genoemd en trekken witte bloedcellen aan naar de plek van de ontsteking. Daarnaast activeren C3a en C5a ontstekingscellen en leiden ze tot contractie van gladde spiercellen, het lekken van de bloedvaten en het vrijmaken van histamine en ontstekingsmediatoren. Het gevolg hiervan is dat een ontsteking (inflammatie) ontstaat en het weefsel rood en warm wordt. Onze eigen cellen zijn beschermd tegen activatie van het complement door zogenaamde complementregulatoren. Deze regulatoren voorkomen dat onze cellen bedekt raken met een laagje C3b of lek raken door het poriecomplex C5b-9 en zodoende een ontsteking veroorzaken.

Zoals al eerder gezegd, kunnen ook dode cellen in ons lichaam het complementsysteem activeren. Elke dag gaan er meer dan 100 miljard van onze cellen (o.a. door veroudering) dood. Tijdens het dood gaan verliezen deze lichaamseigen cellen ook hun complementregulatoren. Hierdoor activeren ook deze cellen het complementsysteem en raken bedekt met C3 om effectief

opgeruimd te worden. Zolang het slechts bij activatie van C3 blijft en er geen C5a en C5b-9 (MAC) gevormd wordt, verloopt dit opruimingsproces geruisloos zonder ontsteking. Personen die bijvoorbeeld C1q missen, ontwikkelen vaak auto-immuun ziekten die samenhangen met het verkeerd opruimen van de enorme hoeveelheid (eigen) dode cellen. Dit laat dus zien hoe belangrijk het complementsysteem ook bij het opruimen van dode cellen is.

### **Complement in nier ischemie/reperfusie schade**

Het complementsysteem heeft dus een belangrijke en gunstige rol in ons immunsysteem. Echter bij bepaalde aandoeningen, zoals I/R in de nier gaat het mis. Door het ATP-tekort tijdens de ischemie en door de reperfusie verliezen de overlevende tubulus epitheelcellen in de nier hun beschermende complementregulatoren. Hierdoor raken deze cellen erg vatbaar voor complementactivatie. De cellen die tijdens de ischemie door het ATP-tekort al dood zijn gegaan, hebben ook hun complementregulatoren verloren. Hierdoor ontstaat in de dagen na de I/R een enorme activatie van het complementsysteem. Een studie in muizen heeft laten zien dat door het C5b-9 complex veel tubulus epitheelcellen lek raken en dood gaan. Daarnaast worden door de vorming van C3a en C5a ook veel ontstekingscellen aangetrokken, gaan de bloedvaatjes openstaan en ontstaat er vochtophoping in de nier (oedeem). Door dit oedeem worden de bloedvaatjes dichtgedrukt en kan er opnieuw ischemie optreden met als gevolg nog meer nierschade. Muizen waarin bepaalde complementfactoren, zoals C3 en MBL genetisch uitgeschakeld zijn, ontwikkelen veel minder schade na reperfusie van de ischemische nier. Ook muizen waarin het C5a therapeutisch weggevangen wordt, ontwikkelen minder I/R schade. Deze studies laten zien dat in muizen het complementsysteem in ieder geval een belangrijke rol speelt in I/R schade.

### **Proefschrift samenvatting**

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was het bestuderen van de rol van het complementsysteem in I/R schade in de nier. Zoals eerder gezegd, bevat het complementsysteem verschillende routes van activatie; de klassieke route via C1q, de lectine route via MBL en de alternatieve route via properdine. Om een therapie te ontwikkelen waarbij het complementsysteem geremd kan worden, is het van belang om te weten welke specifieke routes van het complementsysteem geactiveerd worden na I/R in de nier. Daarnaast is er veel onderzoek gedaan in muizen, maar is er nauwelijks iets bekend over de rol van complement in de mens na I/R van de nier.

In **hoofdstuk 2** hebben we daarom onderzocht welke route van het complementsysteem in werking wordt gezet door muis en menselijke niercellen

na I/R. Vooral de tubulus epitheelcellen in de nier raken beschadigd na I/R. We hebben daarom deze cellen geïsoleerd uit nieren van muizen en mensen, en deze cellen gekweekt in aan- of afwezigheid van zuurstof. Op deze manier simuleerden we het proces van ischemie tijdens een niertransplantatie. Na een aantal uur werden de ischemische niercellen weer van zuurstof voorzien en blootgesteld aan muis of menselijk bloed (reperfusie). Dit bloed bevat de complementfactoren die vervolgens geactiveerd konden worden. Wat we vervolgens waarnamen, was dat de gekweekte muis epitheelcellen na I/R de alternatieve route van het complementsysteem activeerden. We bevestigden daarmee publicaties van anderen betreffende dit onderzoek uitgevoerd in muizen. Verrassend was het echter dat de menselijke tubulus epitheelcellen deze alternatieve complementroute helemaal niet activeerden, maar wel herkend werden door IgM antilichamen en een andere complementfactor, namelijk C1q. Door de binding van IgM en C1q aan deze cellen werd vervolgens de klassieke route van complement geactiveerd. Deze studie laat dus duidelijk zien dat er verschillen zijn tussen muis en menselijke tubulus epitheelcellen en het complementsysteem. Bij het ontwikkelen van een therapie gericht tegen een bepaalde route van het complementsysteem dient hier zeker rekening mee gehouden te worden.

In **hoofdstuk 3** werd onderzocht in welke mate complementactivatie voorkomt na een niertransplantatie in de mens. Hoewel er veel bekend is uit onderzoek in muizen, zijn er nauwelijks onderzoekgegevens beschikbaar van I/R schade na niertransplantatie in de mens. De reden hiervoor is dat I/R schade kort na een niertransplantatie optreedt en het tot op heden niet mogelijk was nierweefsel van patiënten en bloed uit de getransplanteerde nier kort na transplantatie te verkrijgen. We hebben daarom gebruikt gemaakt van een geheel nieuwe methode die recent ontwikkeld is op de afdeling Heelkunde in Leiden. Bij deze methode wordt via een kleine catheter bloed afgenomen dat direct afkomstig is uit de getransplanteerde nier. Hierdoor waren we in staat om daadwerkelijk te meten hoeveel complementactivatie er in de getransplanteerde nier plaatsvindt, terwijl eerder alleen systemische metingen (niet in de nier maar in het lichaam) mogelijk waren. Ook was het mogelijk om zowel voor, als 45 minuten na de niertransplantatie een nierbiopt te nemen, zodat ook in het weefsel onderzocht kon worden in welke mate er activatie van complement plaatsvond op de epitheelcellen. Deze studie vond plaats in drie groepen patiënten. De eerste groep patiënten ontving een nier van een levende donor, de tweede groep van een hersendode donor en de derde groep van een overleden donor. Vooral de donornieren uit de derde groep zijn in relatief slechte staat vanwege de bloedcirculatie die al gedurende langere tijd stilstaat.

In het weefsel en in het bloed werd vervolgens de complementactivatie bepaald



door het aankleuren en meten van C5b-9, het terminale eiwitcomplex van het complementsysteem. Verrassend genoeg was er in alle drie de groepen op het weefsel totaal geen complementactivatie aantoonbaar 45 minuten na de niertransplantatie. Alleen in de patiënten die een nier ontvingen van een overleden donor, was enkele seconden na de reperfusie C5b-9 aantoonbaar in het bloed, dit was echter zeer tijdelijk. Concluderend laat deze studie zien dat in de mens vroeg na transplantatie nauwelijks complementactivatie plaatsvindt in circulatie, en dat deze ook volledig afwezig is op het weefsel. Dit suggereert dat activatie van het complementsysteem in de mens een secundair proces is, en niet ten grondslag ligt aan de initiële ischemie/reperfusie schade die optreedt na niertransplantatie.

Naast het aantonen van complementactivatie in het bloed en op het weefsel, is een derde mogelijkheid het meten van complementactivatieproducten (C5b-9) in de urine. Met de studie beschreven in **hoofdstuk 4** werd getracht dit te doen. Doordat de glomeruli bij een niertransplantatie tijdelijk niet goed werken, kunnen kleine maar ook grotere eiwitten uit het bloed, waaronder ook complementfactoren in de (voor)urine terecht komen. Hier kunnen deze complementfactoren in contact komen met de (ischemische) tubulus epitheelcellen en geactiveerd worden. In eerste instantie vonden we inderdaad een duidelijk en significant verband met complementactivatieproducten (C5b-9) en de hoeveelheid eiwit in de urine afkomstig van getransplanteerde nieren. Echter na enkele controle experimenten met urine van gezonde individuen, waaraan bloed (met nog niet geactiveerde complementfactoren) werd toegevoegd, bleek dat complementactivatie in urine ook spontaan kan optreden zonder enige bijdrage vanuit de nier. Dit was tot nog toe niet bekend en uit vervolgonderzoek bleek dat deze complementactivatie ook kan ontstaan door dode epitheelcellen die normaal gesproken ook via de urine worden uitgescheiden. Het bleek dus niet mogelijk een betrouwbare meting van complementactivatie in urine van transplantatiepatiënten te doen, omdat dit beeld vertroebeld wordt door de spontane activatie die kan optreden. Uit eerdere klinische studies in niertransplantatiepatiënten is gebleken dat patiënten met hoge MBL waarden in het bloed meer afstoting en een slechtere transplantaatoverleving hebben op langere termijn. MBL is het eiwit dat suikergroepen op cellen herkent en vervolgens de lectine route van complement activeert. In **hoofdstuk 5** onderzochten we daarom de rol van MBL in I/R schade in de nier. Ook bestudeerden we de complementfactoren C3 en C5 die door MBL geactiveerd worden. We gebruikten hiervoor een I/R model in de rat, waarbij we voor 45 minuten de vaten naar de linker nier afklemden. Op deze manier wordt de I/R schade gesimuleerd die ook ontstaat wanneer een nier wordt uitgenomen bij een niertransplantatie een enige tijd bewaard wordt, voordat hij teruggeplaatst kan worden. Door de andere nier in de rat te verwijderen, waren

we in de staat de nierfunctie van de tijdelijk afgeklemde nier te meten. Na drie dagen werden de ratten opgeofferd en de nier verwijderd voor onderzoek. Als therapie werd vóór het afklemmen van de nier een antilichaam ingespoten dat aan MBL bindt en hierdoor de werking van dit eiwit blokkeert. In twee andere behandelgroepen werden voor het afklemmen, de complementfactoren C3 en C5 in de rat therapeutisch geremd. Vervolgens werd om de 24 uur bloed afgenomen om de nierfunctie te bepalen. Hieruit bleek dat ratten die tijdelijk geen MBL in het bloed hadden, volledig beschermd waren tegen I/R schade als gevolg van het afklemmen. Dit betekent dus inderdaad dat MBL, dat normaal belangrijk is voor de afweer tegen ziekteverwekkers, een zeer nadelige rol heeft in niertransplantatie. Verrassend genoeg waren de ratten waarin C3 en C5 geremd werd, totaal niet beschermd. Omdat MBL bekend staat als een complementeiwit dat C3 uiteindelijk activeert, was deze vinding bijzonder. Dit betekent namelijk dat de nadelige werking van MBL in I/R schade in de nier onafhankelijk is van complementactivatie, iets dat totaal onbekend is. We konden laten zien dat kort na reperfusie, MBL uit de bloedvatjes lekt en bindt aan de tubulus epitheelcellen in de nier. Vervolgens gaan deze epitheelcellen dood, waarna dan pas het complementsysteem geactiveerd wordt. Complementactivatie vindt dus uiteindelijk wel plaats, maar de initiële schade ontstaat door MBL. Wanneer we gekweekte menselijke tubulus epitheelcellen blootstelden aan (uit bloed gezuiverd) MBL, trad binnen 24 uur celdood op. Hierdoor konden we laten zien dat niet alleen in de rat, maar ook bij mensen blootstelling van de nier aan MBL schadelijk is. Via welke mechanisme MBL de epitheelcellen doodt, wordt nu vervolgens onderzocht.

In **hoofdstuk 6** wordt dit onderzoek naar de cytotoxische (celdodende) werking van MBL op tubulusepitheel beschreven. We laten zien dat MBL bindt en opgenomen wordt in de tubulus epitheelcellen. Vervolgens ontstaat er stress in het deel van de cel, dat verantwoordelijk is voor de productie van eiwitten, het endoplasmatisch reticulum (ER). Als gevolg van deze ER-stress ontstaat er ook een probleem in de mitochondriën van de cellen en komen deze zonder ATP te zitten. In ratten konden we daarnaast laten zien dat het eiwit GRP78 in de tubulus epitheelcellen van de nier binnen enkele uren na reperfusie volledig verdwijnt, waarna deze cellen vervolgens dood gingen. GRP78 is een eiwit in het ER dat ervoor zorgt dat nieuw-geproduceerde eiwitten goed in elkaar gezet en gevouwen worden. Zonder GRP78 ontstaat er een ophoping van niet-functionerende eiwitten in het ER en raken de cellen gestrest (ER-stress) en gaan uiteindelijk dood. Wanneer we nu voor de reperfusie, MBL therapeutisch blokkeerden in deze ratten, bleef het GRP78 ook aanwezig in de cellen en overleefden deze de ischemie/reperfusie. Dit laat dus duidelijk zien dat het wegvangen van MBL voorkomt dat het onmisbare GRP78 in de epitheelcellen

verdwijnt en er ischemie/reperfusie schade ontstaat.

In **hoofdstuk 7** onderzochten we of het medicijn, recombinant menselijk C1 inhibitor (rhC1INH) dat momenteel gebruikt worden in de behandeling van hereditair angio-oedeem, ook effectief is tegen I/R schade in de nier. De hypothese is dat rhC1INH voorkomt dat de vaatjes gaan lekken na I/R waardoor MBL niet bij de epitheelcellen kan komen. Ten tweede remt het enkele complementfactoren en ten derde is er een direct remmend effect op MBL mogelijk, omdat rhC1INH enkele suikergroepen bevat waaraan MBL mogelijk kan binden. rhC1INH werd getest in het I/R model in de rat. Vijf minuten voor het afklemmen van de nier werd het ingespoten. Bloedmonsters werden vervolgens afgenomen om de nierfunctie te bepalen en na 24 uur werd de nier uitgenomen voor analyse. Helaas bleek het rhC1INH niet beschermt tegen I/R schade. Uit vervolgonderzoek bleek dat rhC1INH erg snel verwijderd wordt uit het bloed en daarnaast niet in staat is om het cytotoxische effect van MBL te remmen.

Omdat na I/R, MBL uit de vaatjes lekt en zodoende bij de epitheelcellen kan komen, werd in **hoofdstuk 8** onderzocht hoe de stabiliteit van deze vaatjes gereguleerd wordt. Angiopoetines zijn eiwitten die hierbij nauw betrokken zijn. Bepaalde cellen die de bloedvaten ondersteunen (pericyten) produceren Angiopoetine-1 (Ang-1), dat belangrijk is voor de stabiliteit van het bloedvat. Angiopoetine-2 (Ang-2), dat juist tegenovergesteld werkt en zorgt dat de vaatjes gaan lekken, kan worden geproduceerd door endotheelcellen aan de binnenkant van de bloedvaten. Zolang er meer Ang-1 dan Ang-2, blijven de bloedvaatjes stabiel. Wanneer echter door een niertransplantatie de endotheelcellen gestrest raken, wordt er meer Ang-2 geproduceerd en ontstaat er een verkeerde balans waardoor de bloedvaten gedestabiliseerd raken en gaan lekken. Hierdoor zou het onder andere mogelijk zijn dat MBL uit de vaatjes lekt, vervolgens bij de epitheelcellen kan komen en de tubulus epitheelschade veroorzaakt. Naast het wegvangen van MBL zou een therapie gericht op het stabiel houden van de bloedvaatjes daarom ook succesvol kunnen zijn. Ten eerste omdat dan voorkomen zal worden dat het MBL uit de bloedvaatjes lekt en bij de tubulus epitheelcellen kan komen. Ten tweede wordt de vorming van oedeem voorkomen en ten derde zal de ophoping van ontstekingscellen die uit het bloed komen, ook minder zijn.

## Conclusie

Het complementsysteem speelt een belangrijke en gunstige rol in het opruimen van ziekteverwekkers en dode cellen in ons lichaam. Echter, bij een niertransplantatie kan complementactivatie nadelig zijn en de I/R schade juist verergeren door het vrijkomen van C3a en C5a, en de vorming van het C5b-9 complex. Studies in muizen hebben een belangrijke rol aangetoond voor de alternatieve route van complementactivatie op (ischemische) tubulus epitheelcellen. In dit proefschrift

hebben we aangetoond dat bij ischemische menselijke tubulus epitheelcellen de klassieke route van complementactivatie betrokken is, wat laat zien dat er belangrijke verschillen zijn in het tubulusepitheel en complementsysteem tussen muis en mens. Daarnaast hebben we laten zien dat slechts enkele seconden na reperfusie er enige mate van complementactivatie in de circulatie optreedt, terwijl deze volledig afwezig is op de tubulus epitheelcellen. Ook hebben we aangetoond dat in de urine spontane complementactivatie kan optreden wanneer bloed in contact komt met urine. Dit proces is volledig onafhankelijk van de nier en maakt het lastig om betrouwbare complementmetingen te verrichten in de urine.

In het I/R model in de rat hebben we vervolgens laten zien dat complementactivatie pas optreedt nadat er al I/R schade is ontstaan. Complementactivatie na I/R is dus meer een secundair proces en ligt niet ten grondslag aan de initiële I/R schade in de nier. Complementactivatie op beschadigde en dode tubulus epitheelcellen treedt uiteindelijk wel op, maar op een relatief laat moment na reperfusie. De belangrijkste vinding van dit promotieonderzoek is dat echter vroeg na reperfusie, MBL uit het bloed in de nier terechtkomt en wordt blootgesteld aan de tubulus epitheelcellen. MBL heeft vervolgens een cytotoxische (celdodende) werking op deze cellen. De cytotoxische werking van MBL is echter volledig onafhankelijk van complementactivatie. Het remmen van C3 en C5 beschermd daarom ook niet tegen I/R schade, terwijl het wegvangen van MBL bijna volledige bescherming bood. Ook konden we laten zien dat de blootstelling van MBL en het dood gaan van de tubulus epitheelcellen voorafging aan de activatie van het complementsysteem. MBL is daarom een zeer interessant therapeutisch doelwit en het tijdelijk remmen of wegvangen van MBL tijdens een klinische niertransplantatie zou daarom een veelbelovende behandeling kunnen zijn om I/R schade na niertransplantatie te voorkomen.

## LIST OF ABBREVIATIONS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
AKI	acute kidney injury
ANG-1	angiopoietin-1
ANG-2	angiopoietin-2
AP	alternative pathway
ATF6	activating transcription factor 6
ATN	acute tubular necrosis
ATP	adenosine triphosphate
BDD	brain dead donor
BUN	blood urea nitrogen
CDD	cardiac dead donor
COMP	cartilage oligomeric matrix protein
CP	classical pathway
CRD	carbohydrate recognition domain
CRP	complement regulatory protein
CVF	cobra venom factor
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAMP	danger-associated molecular pattern
DC	dendritic cell
DGF	delayed graft function
DIG	digitonin
EC	endothelial cell
ER	endoplasmic reticulum
ERAD	ER-associated protein degradation
FITC	fluorescein isothiocyanate
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine
GPR78	78-kDa glucose-regulated protein
HMGB1	High mobility group box 1
HPF	high power field
HRP	horseradish peroxidase
HSA	human serum albumin
HTK	histidine-tryptophan-ketoglutarate

HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
I/R	ischemia/reperfusion
IM-PTEC	immortalized mouse proximal tubular epithelial cells
IRE-1	inositol-requiring enzyme-1
IRI	ischemia/reperfusion injury
KIM-1	kidney injury molecule-1
LD	living donor
LP	lectin pathay
mAb	monoclonal antibody
MAC	membrane attack complex
MASP	MBL-associated serine protease
MBL	mannan-binding lectin
MCP-1	macrophage chemoattractant protein-1
Mph	macrophage
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NHS	normal human serum
NMS	normal mouse serum
PDGFR $\beta$	platelet derived growth factor receptor $\beta$
PDI	protein disulfide isomerase
PERK	pancreatic ER kinase
PI	propidium iodide
PMN	neutrophil
PO <sub>2</sub>	partial pressure of oxygen
PRR	pattern recognition receptors
PTEC	proximal tubular epithelial cell
RECA-1	rat endothelial cell antigen-1
rhC1INH	recombinant human C1 inhibitor
ROS	reactive oxygen species
RPS-15	ribosomal protein S-15
SD	standard deviation
SEM	standard error of the mean
SNP	single nucleotide polymorphism
TLR	toll-like receptor
UPR	unfolded protein response
UW	University of Wisconsin

## CURRICULUM VITAE

De schrijver van het proefschrift, Pieter van der Pol, werd geboren op 21 maart 1983 in Rotterdam. In 2001 behaalde hij het VWO diploma aan het Wartburg College te Rotterdam. In datzelfde jaar begon hij met de studie Life Science & Technology aan de Universiteit Leiden en Technische Universiteit Delft. Tijdens deze studie verrichtte hij een Bachelor onderzoeksstage op de afdeling Nierziekten van het LUMC te Leiden onder supervisie van Dr. A. Roos en Prof. Dr. M.R. Daha. Tijdens deze stage deed hij onderzoek naar de interactie tussen Mannan-binding lectin en humaan polymeer serum IgA in het kader van IgA nefropathie. De Master onderzoeksstage tijdens deze opleiding verrichtte hij op de afdeling Virologie van het Erasmus MC te Rotterdam onder supervisie van Dr. B. Martina en Prof. Dr. A.D.M.E Osterhaus. Tijdens deze stage werd onderzoek gedaan naar de immuunrespons tegen het West-Nijlvirus in C57BL/6 muizen. De studie Life Science & Technology werd afgesloten in 2006 met de Master "Functional Genomics". Aansluitend hierop begon hij in oktober 2006 aan een Nierstichting-gefinancierd promotieonderzoek getiteld "The role of the lectin pathway of complement in renal ischemia/reperfusion injury and transplant rejection" op de afdeling Nierziekten van het LUMC onder supervisie van Prof. Dr. M.R. Daha en na diens emeritaat onder supervisie van Prof. Dr. C. van Kooten. De resultaten van het promotieonderzoek zijn beschreven in dit proefschrift. Eind 2011 ontving hij een Kolff Postdoc Startup beurs van de Nierstichting getiteld "The role of ER-stress and autophagy in MBL-mediated tubular epithelial cell death following renal ischemia/reperfusion". Vanaf 2012 verricht hij op dit onderwerp postdoctoraal onderzoek in de onderzoeksgroep van Prof. Dr. C. van Kooten.





## BIBLIOGRAPHY

1. M Khairoun\*, P van der Pol\*, DK de Vries, E Lievers, N Schlagwein, HC de Boer, IM Bajema, JL Rotmans, AJ van Zonneveld, TJ Rabelink, C van Kooten, ME Reinders. Renal ischemia/reperfusion induces a dysbalance of angiopoietins, accompanied by proliferation of pericytes and fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Sep;305(6):F901-1  
\* shared first author
2. DK de Vries\*, P van der Pol\*, GE van Anken, DJ van Gijlswijk, J Lindeman, AFM Schaapherder, C van Kooten. Acute but transient release of terminal complement complex after reperfusion in clinical kidney transplantation. *Transplantation*. 2013 Mar 27;95(6):816-20  
\* shared first author
3. CT Mauriello, HK Pallera, JA Sharp, JL Woltmann Jr, S Qian, PS Hair, P van der Pol, C van Kooten, NM Thielens, FA Lattanzio, KM Cunnion, NK Krishna. A novel peptide inhibitor of classical and lectin complement activation including ABO incompatibility. *Mol Immunol*. 2013 Jan;53(1-2):132-9D
4. M Eikmans, I de Canck, P van der Pol, CC Baan, GW Haasnoot, MJK. Mallat, MJ Vergunst, E de Meester, JI Roodnat, JD Anholts, M van Thielen, II Doxiadis, JW de Fijter, PJ van der Linden, E van Beelen, C van Kooten, JA Kal-van Gestel, AM Peeters, W Weimar, DL Roelen, R Rossau, FH Claas. The functional polymorphism Ala258Ser in the innate receptor gene ficolin-2 in the donor predicts improved renal transplant outcome. *Transplantation*. 2012 Sep 15;94(5):478-85
5. A Zaferani, RR Vivès, P van der Pol, GJ Navis, MR Daha, C van Kooten, H Lortat-Jacob, MA Seelen, J van den Born. Factor H and properdin recognize different epitopes on renal tubular epithelial heparan sulfate. *J Biol Chem*. 2012 Sep 7;287(37):31471-81
6. P van der Pol\*, DK de Vries\*, DJ van Gijlswijk, GE van Anken, Z Aydin, MR Daha, JW de Fijter, AFM Schaapherder, C van Kooten. Pitfalls in urinary complement measurements. *Transpl Immunol*. 2012 Aug;27(1):55-8  
\* shared first author

7. KA Kortekaas, P van der Pol, JH Lindeman, CC Baan, C van Kooten, RJ Klautz. No prominent role for terminal complement activation in the early myocardial reperfusion phase following cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012 May;41(5):e117-25
8. P van der Pol, N Schlagwein, DJ van Gijlswijk, SP Berger, A Roos, IM Bajema, HC de Boer, JW de Fijter, GL Stahl, MR Daha, C van Kooten. Mannan-binding lectin mediates renal ischemia/reperfusion injury independent of complement activation. *2011 Am J Transplant.* 2012 Apr;12(4):877-87
9. J O'Flynn, R Flierman, P van der Pol, A Rops, SC Satchell, PW Mathieson, C van Kooten, J van der Vlag, JH Berden, MR. Daha. Nucleosomes and C1q bound to glomerular endothelial cells serve as target for autoantibodies and determine complement activation. *Mol Immunol.* 2011 Oct;49(1-2):75-83
10. P van der Pol, A Roos, SP Berger, MR Daha, C van Kooten. Natural IgM antibodies are involved in the activation of complement by hypoxic human tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiology* 2011 Apr;300(4):F932-40
11. LJA D'Orsogna, NM van Besouw, EMW. van der Meer-Prins, P van der Pol, ME Franke-van Dijk, YM Zoet, A van der Slik, W Weimar, C van Kooten, A Mulder, DL Roelen, IIN Doxiadis, FHJ Claas. Vaccine-induced allo-HLA-reactive memory T cells in a kidney transplantation candidate. *Transplantation.* 2011 Mar 27;91(6):645-51
12. LJA D'Orsogna, DL Roelen, EMW van der Meer-Prins, P van der Pol, ME Franke-van Dijk, M Eikmans, J Anholts, J Rossjohn, J McCluskey, A Mulder, C van Kooten, IIN Doxiadis, FHJ Claas. Tissue specificity of crossreactive allogeneic responses by EBV EBNA3A-specific memory T cells. *Transplantation.* 2011 Mar 15;91(5):494-500
13. A Zaferani, RR Vivès, P van der Pol, JJ Hakvoort, GJ Navis, H van Goor, MR. Daha, H Lortat-Jacob, MA Seelen, J van den Born. Identification of tubular heparan sulfate as a docking platform for the alternative complement component properdin in proteinuric renal disease. *J Biol Chem.* 2011 Feb 18;286(7):5359-67