



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Molecular mechanisms involved in renal injury-repair and ADPKD progression**

Formica, C.

### **Citation**

Formica, C. (2020, September 10). *Molecular mechanisms involved in renal injury-repair and ADPKD progression*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136523>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/136523>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



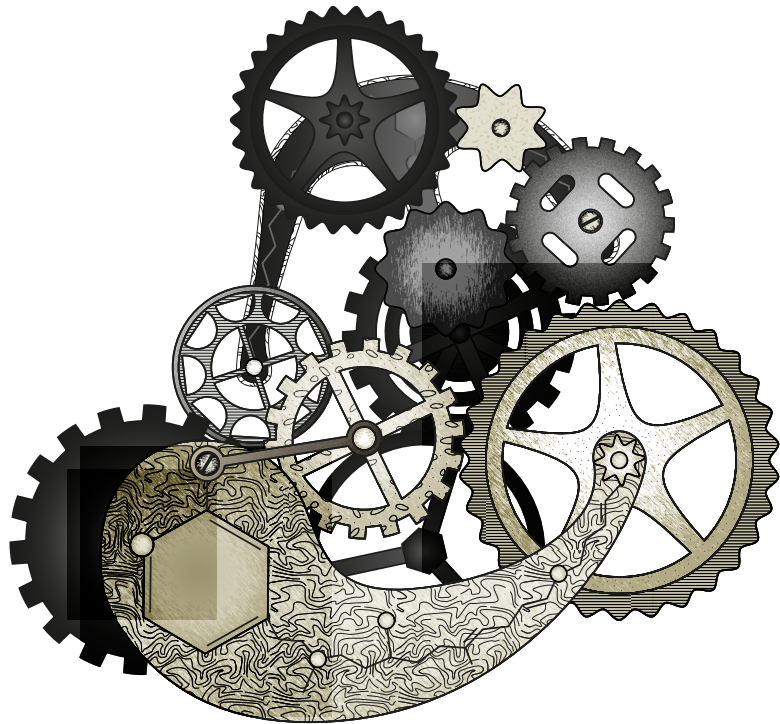
The handle <http://hdl.handle.net/1887/136523> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Formica, C.

**Title:** Molecular mechanisms involved in renal injury-repair and ADPKD progression

**Issue Date:** 2020-09-10

# Appendix





## Nederlandse samenvatting

Autosomaal dominant overervende cystenieren, in het Engels Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD), is een systemische ziekte die meestal wordt veroorzaakt door een mutatie in het *PKD1* of *PKD2* gen. Deze genen coderen respectievelijk voor de eiwitten Polycystine 1 (PC1) en Polycystine 2 (PC2). Het belangrijkste kenmerk van ADPKD is het ontstaan van met vocht gevulde cysten in de nieren, welke de normale nierstructuur en nierfunctie aantasten, wat uiteindelijk leidt tot nierfalen. ADPKD heeft ook enkele extra-renale ziektemanifestaties, zoals cystevorming in de lever en alvelesklier, en vasculaire afwijkingen. Momenteel is er geen medicijn dat ADPKD kan genezen, en daarom is het van groot belang om beter inzicht te krijgen in de mechanismen die betrokken zijn bij cystevorming, cystegroei en ziekteprogressie.

In patiënten met ADPKD nemen de cysten gedurende het leven toe, zowel in aantal als in grootte. De cellen die de cystewand bekleden delen actief, en scheiden vloeistof uit in het lumen van de cyste, wat bijdraagt aan de groei. Cystegroei en expansie veroorzaken mechanische stress in het omliggende weefsel. Dit gaat gepaard met de secretie van cytokines en groeifactoren, welke infiltrerende cellen aantrekken. Deze zorgen weer voor lokale schade en fibrose. Constante proliferatie, ontsteking en fibrose verstoren de nierarchitectuur, wat uiteindelijk leidt tot nierfalen. Opvallend is dat proliferatie, ontsteking en fibrose ook vaak worden waargenomen na acute nierschade. In een gezonde nier zorgt de activatie van deze mechanismen voor herstel van het weefsel, maar in patiënten met ADPKD zorgt de activatie van deze mechanismen juist voor het verergeren van de ziekte.

In de literatuur wordt het sterke verband tussen de schade-herstel mechanismen en ADPKD progressie beschreven. Op basis van deze aanname is het doel van dit proefschrift om de moleculaire mechanismen betrokken bij zowel schade-herstel van de nier als ADPKD progressie te bestuderen, om zo de ontwikkeling van de ziekte beter te begrijpen en nieuwe inzichten voor toekomstige studies en therapeutische behandelingen te krijgen.

In **hoofdstuk 1** geven we een uitgebreide beschrijving van de huidige kennis over de moleculaire mechanismen betrokken bij nierschade-herstel en ADPKD progressie.

In **hoofdstuk 2** onderzoeken we de rol van Four-jointed box protein 1 (FJX1) in nierschade en ADPKD progressie. FJX1 is een eiwit dat betrokken is bij de regulatie van twee belangrijke pathways die ontregeld zijn in ADPKD: planar cell polarity (PCP), die de oriëntatie van de epitheelcellen controleert en Hippo signalering, die orgaangrootte controleert. In een eerdere studie, gedaan door onze groep, kwam FJX1 afwijkend tot expressie gedurende zowel de nierschade-herstelfase en PKD progressie in muizen, wat een mogelijke rol voor

FJX1 in cystevorming/groei en ziekteprogressie suggereert. Voor deze studie hebben we *Pkd1* knock-out (KO) muizen (een muismodel voor ADPKD) gebruikt om te onderzoeken of het uitschakelen van *Fjx1* de activiteit van de PCP of de Hippo pathway kon beïnvloeden. Ook hebben we onderzocht of dit een effect had op ziekteprogressie, mét en zonder extra nierschade. We konden geen bewijs vinden voor een veranderde regulatie van de PCP of de Hippo pathway. Echter, we zagen wel een beschermend effect van *Fjx1* uitschakeling op fibrose en de infiltratie van immuuncellen. Dit zorgde ervoor dat de muizen langer in leven bleven, wat suggereert dat de modulatie van de fibrotische respons kan helpen in het controleren van de ziekteprogressie.

In **hoofdstuk 3** doen we verder onderzoek naar de rol van de Hippo pathway in PKD progressie. De Hippo pathway is een sterk geconserveerde signaaloverdrachtsroute die orgaangroei reguleert. Meerdere moleculaire mechanismen die door de Hippo pathway worden gecontroleerd, zijn ook belangrijk in cystegroei. In een eerdere studie zagen we inderdaad een verhoogde expressie van één van de downstream effectormoleculen van de Hippo pathway, het eiwit YAP, in de kern van het cyste-epitheel. Daarom veronderstellen we in hoofdstuk 3 dat het verlagen van de hoeveelheid YAP in *Pkd1* KO muizen, mogelijk het cysteuze fenotype kan verbeteren. We besloten een strategie te volgen gebaseerd op antisense oligonucleotiden (ASO), waarmee we specifiek de hoeveelheid YAP significant konden verlagen in de nieren. We zagen geen effect op de ziekteprogressie, maar zagen wel dat het vergelijkbare eiwit TAZ sterk ophoopt in de celkernen van nierepithelcellen. Dit suggereert dat TAZ het verlies van YAP kan compenseren. We hebben ook het effect van het uitschakelen van *Yap* of *Taz* op cystevorming/groei onderzocht in 3-dimensionale celkweken. We zagen dat het uitschakelen van *Yap* leidt tot een verstoorde organisatie van de cellen, waardoor de cellen geen cysten met een lumen vormden, maar groeiden als een soort tumor. De cellen waarin *Taz* was uitgeschakeld lieten daarentegen geen verstoringen zien. Alles bij elkaar genomen concluderen we op basis van onze data dat het moduleren van YAP geen geschikte benadering is om ADPKD te behandelen.

In **hoofdstuk 4** hebben we de analyse van genexpressie (RNAseq analyse) in ons diermodel voor ADPKD, gecombineerd met genexpressieprofielen die openbaar beschikbaar zijn in de literatuur, om zo een lijst van genen te identificeren die ontregeld zijn in PKD (de 'PKD Signature'). Bovendien hebben we de link tussen PKD progressie en nierschade-herstel mechanismen onderzocht door de 'PKD Signature' te vergelijken met nierschade-herstel genexpressieprofielen. Tenslotte hebben we verschillende ADPKD muismodellen, met en zonder toxische nierschade, gebruikt om onze bevindingen te valideren.

In **hoofdstuk 5** bouwen we voort op het werk in hoofdstuk 4. We concentreren ons op de transcriptiefactoren (TFs) die veranderd zijn in zowel PKD progressie als nierschade-herstel.

TFs zijn eiwitten die de transcriptie van genen controleren, en dus hun expressie reguleren. Na het selecteren van een aantal veelbelovende TFs door middel van computeranalyses, hebben we onze selectie gevalideerd met laboratoriumexperimenten. Met verschillende technieken hebben we aangetoond dat twee TFs (STAT3 en RUNX1) actiever zijn tijdens nierschade én in cystenieren, vergeleken met normale nieren, in zowel muizen als patiënten. Ook hebben we laten zien dat de expressie van een aantal voorspelde targetgenen van deze TFs verhoogd is na nierschade én in cystenieren, wat nogmaals laat zien dat de twee gevonden TFs actiever zijn tijdens nierschade en in cystenieren.

Tenslotte worden in **hoofdstuk 6** een algemeen overzicht van de resultaten, zoals beschreven in de vorige hoofdstukken, en suggesties voor verder onderzoek besproken.