



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Molecular and genetic markers for the prediction of kidney transplant outcome

Yang, J.

Citation

Yang, J. (2018, December 19). *Molecular and genetic markers for the prediction of kidney transplant outcome*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/67425>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/67425>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

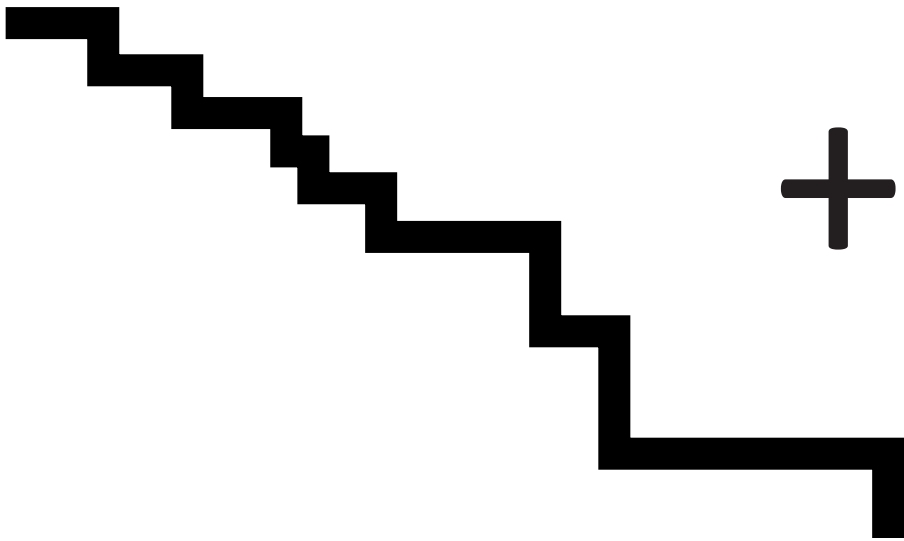


The handle <http://hdl.handle.net/1887/67425> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Yang, J.

Title: Molecular and genetic markers for the prediction of kidney transplant outcome

Issue Date: 2018-12-19



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Niertransplantatie is de behandeling bij voorkeur voor patiënten met een eindstadium van nierfalen, aangezien het leidt tot betere overleving en hogere kwaliteit van leven vergeleken met dialyse. Het voorspellen van het optreden van DGF, de respons op de behandeling van acute afstoting en lange-termijn uitkomst na niertransplantatie is moeilijk op basis van enkel de klinische parameters. In het eerste deel van dit proefschrift hebben wij beoogd om moleculaire markers voor steroïd-resistente afstoting en lange-termijn overleving te onderzoeken in biopsieën. In het tweede deel hebben wij ons gericht op genetische markers die gerelateerd zijn aan het optreden van acute afstoting. Expressie van S100 calcium-bindende eiwitten A8 en A9 had in eerdere studies verband met de uitkomst na niertransplantatie. In het laatste gedeelte van dit proefschrift hebben wij aanwijzingen gevonden voor immuun-regulerende effecten van deze S100 eiwitten.

Keuze van SYBR green master mix

Kwantitatieve polymerase ketting reactie (qPCR) is een gevoelige en specifieke techniek om, gebaseerd op SYBR green chemie, genexpressieniveaus te meten. Het type van PCR apparaat en master mix kunnen van invloed zijn op de nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van de assay. Drie commerciële PCR mixen (ABI, Bio-Rad, Roche) werden getest voor 79 verschillende primerparen die elk een immuun-gerelateerd transcript detecteren. Wij vonden dat de meeste primersets (n=66, 93%) leidden tot één enkel PCR product, zolang het voorgeschreven PCR protocol per mastermix van de overeenkomstige firma strikt gehanteerd werd. Het gebruik van ABI mix, in vergelijking met de andere mixen, leidde tot lagere C_q-waarde (hoger expressiesignaal) in het cDNA en lagere achtergrondniveaus bij negatieve controle DNA samples. Het type van PCR-apparaat had een kleinere invloed op de resultaten dan de bron van de master mix. Gebaseerd op de data hebben wij besloten om alle transcripten in biopsiemateriaal te meten met de ABI mix op een Viia7 PCR apparaat (ABI).

Relatie tussen pre-transplantaat genexpressie-niveaus en de type van donor

In transplantaties van een nier van een overleden donor was geen van de bestudeerde markers in het pre-transplantaat biopt voorspellend voor het optreden van DGF. Expressie van C2, C3 en Bax:Bcl-2 ratio was hoger in transplantaten van overleden donoren vergeleken met die van levende donoren, wat duidt op een rol van complement en geprogrammeerde celdood (apoptose) bij ischemie-reperfusie schade. Verder bevestigen deze bevindingen resultaten van eerdere studies, dat complement-componenten het hoogst aanwezig zijn in donororganen van overleden donoren en dat apoptose geïnduceerd wordt door normothermische ischemieschade. Remming van complement en apoptose zou daarmee een beschermingsmiddel kunnen zijn tegen de effecten van ischemie-reperfusie schade.

Veranderingen in genexpressie zijn het resultaat van ontstekingsinfiltraat

Veranderingen in genexpressie werden bekeken bij 75 patiënten tussen het moment vóór transplantatie en het moment van acute afstoting na transplantatie. Het merendeel van de bestudeerde markers (TLR-1, -2, -3, -6, -7, -8, -9, -10; C2; Bcl:Bcl2) was toegenomen in expressie ten tijde van acute afstoting, terwijl een aantal markers (C4; CD46, CD55, CD59) een afname in expressie lieten zien. Met immunohistochemie konden we bevestigen dat expressie voor TLR4, TLR9 en BCL2 in het biopt verhoogd is ten tijde van acute afstoting. De veranderingen tijdens acute afstoting zouden het gevolg kunnen zijn van een verhoogde mate van ontstekingsinfiltraat. Inderdaad lieten vele van deze markers voor aangeboren immuniteit een verband zien met de hoeveelheid expressie van één of meerdere van de volgende ontstekingsmarkers: CD3e, CD20, CD68 en CD163.

Risico-inschatting van het optreden van steroïd-resistente acute afstoting: de E-score

Steroïd-resistente acute afstoting heeft vaak een ongunstige lange-termijn uitkomst als gevolg. Een betere voorspelling van steroïd-resistentie van de patiënt bij behandeling van een acute afstoting zou de mogelijkheid kunnen geven om patiënten eerder te behandelen met de juiste medicatie en om onherstelbare nierschade te beperken gedurende de periode van de steroïdentherapie. In hoofdstuk 4 vonden wij dat een toegenomen mRNA expressie van endotheel-epitheel-gerelateerde genen op moment van acute afstoting de respons op de steroïdentherapie voorspelt.

Het endotheel-epitheel transcriptieprofiel (TM4SF18, PGM5, CD34), dat betrokken is bij bloedvatvorming en cel-cel adhesie, is waarschijnlijk een afspiegeling van de kwaliteit van de nefronen en het vermogen van de cellen om weefselschade te herstellen. Deze veronderstelling zou verklaren waarom een verlaagd expressieprofiel juist gezien wordt bij steroïd-resistente afstoting. In dezelfde lijn is aangetoond dat ernstige ontsteking van de wanden van de grote vaten en beschadiging van de microvaatjes in de nier steroïd-resistentie van de afstoting voorspellen. Daarom zouden de endotheel-epitheel-gerelateerde expressieprofielen een nieuwe marker kunnen zijn voor dit type van afstoting.

Voorspelling van lange-termijn transplantaatoverleving

In hoofdstuk 3 vonden we dat patiënten met een hoge TLR4 expressie tijdens acute afstoting een slechtere transplantaatoverleving hebben dan patiënten met een lage TLR4 expressie. TLR4 in het transplantaat kan binden aan intracellulaire liganden die vrijkomen bij celdood, en daarmee een pro-inflammatoir signaal vormen. Dus de hoge TLR4 expressie zou kunnen leiden tot een hogere productie van pro-inflammatoire cytokines en chemokines die ontsteking bevorderen in het transplantaat na de anti-afstoting therapie en daarmee bijdragen aan chronische transplantaatbeschade.

Een hoge Bax:Bcl2 ratio tijdens acute afstoting voorspelt ongunstige transplantaatuitkomst op de lange termijn en het zou een afspiegeling kunnen zijn van een verhoogde mate van



apoptose in het transplantaat. Apoptose van niercellen kunnen direct leiden tot verlies van nierfunctie. Indien de apoptotische cellen niet tijdig opgeruimd worden, ondergaan ze necrose en scheiden ze schade-gerelateerde moleculaire patronen uit die de immunrespons verder op gang zetten. Het vervolgen van de Bac:Bcl2 ratio tijdens acute afstoting kan dus van prognostische waarde zijn. Toekomstige studies zouden een diepgaande analyse moeten bevatten van dode en stervende cellen in het transplantaat en hun mogelijke effect op uitkomst.

Genetische risicofactoren bij niertransplantatie: klein effect en gebrek aan validatie

In hoofdstuk 5 hebben wij een genoom-brede associatiestudie (GWAS) bij acute afstoting van niertransplantaten uitgevoerd. Significante SNPs die geïdentificeerd werden in het ene cohort konden niet geverifieerd worden in een tweede, onafhankelijk cohort. Een uitzondering was rs1801274 in het FCGR2 gen: een hogere frequentie van het C-nucleotide voor deze SNP werd gevonden bij patiënten met acute rejectie; en dat in beide cohorten. De voornaamste beperking van GWAS is de noodzaak voor sterke significantie ($P < 5 \times 10^{-8}$) voor een individuele SNP in relatie tot de klinische uitkomst. Individuele SNPs die geïdentificeerd worden met GWAS hebben doorgaans maar een klein effect (<10%) op een complex, multifactorieel fenomeen zoals acute afstoting. Om daadwerkelijk betrouwbaar op zich zelf staande SNPs te identificeren die iets zeggen over uitkomst, is het nodig om de groepsgrootte van het cohort uit te breiden door middel van (inter)nationale samenwerking op het gebied van niertransplantatie.

De rol van non-HLA antigenen bij niertransplantatie wordt met toenemende mate benadrukt. Zoals aangetoond in hoofdstuk 6 vonden wij geen effect van genomische missense SNP mismatching op niertransplantatie-uitkomst. De totale hoeveelheid van gemismatchte SNPs, die binnen coderende genoomsequenties liggen, tussen ontvanger en donor heeft geen effect op klinische uitkomst. Een reden voor de negatieve bevinding kan zijn dat het effect van mismatching van missense SNPs laag is, onder het regime van HLA mismatching en efficiënte immunosuppressieve medicatie.

Het immuunregulerend effect van S100 calcium-bindende eiwitten A8 en A9

Relatief hoge weefselexpressie van S100A8 en S100A9 tijdens acute afstoting is geassocieerd met een gunstig beloop na transplantatie. We vonden in hoofdstuk 8 dat het merendeel van S100A9-positieve cellen ook CD68 en HLA-DR tot expressie brengen, en slechts een klein deel CD163. Dit suggereert dat S100A9 een marker is voor een specifieke macrofaagpopulatie die het transplantaat infiltreert. Verder vonden we dat de mate van S100A9 expressie behoorlijk varieert binnen de CD14+ myeloïde celpopulatie. Deze variatie kon helaas niet worden gekoppeld aan functionaliteit. Wel vonden we dat overexpressie van S100A8/A9 in macrofagen leidt tot een verhoogde productie van reactieve zuurstof radicalen (ROS) en IL-10 mRNA expressie. Het extracellulaire ROS kan een negatieve invloed hebben op activatie

en deling van T cellen, wat leidt tot verlaagd immuunrespons in het transplantaat. IL-10 zou daarbij ontstekingsremmend kunnen zijn. Wij poneren dat het anti-inflammatoire effect van S100A8/A9 eiwitten hun gunstig klinisch effect op transplantaatoverleving verklaart.

Conclusies

De resultaten die gepresenteerd zijn in dit proefschrift laten zien dat verscheidene moleculaire en genetische markers gerelateerd zijn aan niertransplantaat-uitkomst. We hebben laten zien dat een verlaagd expressieprofiel voor endotheel/epitheel cellen tijdens acute afstoting geassocieerd is met ongevoeligheid voor steroïdenbehandeling. De verhoogde TLR4 expressie en Bac:Bcl2 ratio tijdens acute afstoting voorspellen onafhankelijk van elkaar ongunstig beloop van het transplantaat. Voorgaande studies hebben laten zien dat relatief hoge expressie van S100A8 en S100A9 tijdens acute afstoting juist gerelateerd zijn aan een gunstig beloop na transplantatie. In dit proefschrift hebben we laten zien dat de overexpressie van S100A8/A9 in macrofagen leidt tot een hogere productie van ROS en IL-10 door deze cellen. Deze bevinding zou het gunstige klinische effect van de S100 moleculen op niertransplantaat-overleving kunnen verklaren. Tenslotte liet een genom-brede associatiestudie zien dat individuele genetische puntmutaties in het genoom slechts een minimale bijdrage hebben in het risico voor acute afstoting, en dat toekomstige studies op dit gebied brede (inter)nationale samenwerking vereisen.

