



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Fibrogenesis in progressive renal disease

Baelde, J.J.

Citation

Baelde, J. J. (2005, December 12). *Fibrogenesis in progressive renal disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4289>

Version: Corrected 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/1887/4289>

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



Nederlandse Samenvatting

Nederlandse samenvatting

De nieren hebben een belangrijke functie in het menselijk lichaam: ze zijn onder andere verantwoordelijk voor het zuiveren van bloed en het produceren van urine. Wanneer de nier chronisch beschadigd wordt door bijvoorbeeld glomerulonefritis, hoge bloeddruk (hypertensie), afwijkingen van de stofwisseling (diabetes) of opname van giftige stoffen (bijv. sommige geneesmiddelen) kan dit leiden tot verbindweefseling in de nier. Deze schade kan klinisch leiden tot een langzame achteruitgang van de nierfunctie en histologisch tot een toename van extracellulaire matrix (ECM) componenten. Uiteindelijk zal dit leiden tot de ontwikkeling van glomerulosclerose en interstitiële fibrose, een proces dat ook wel fibrogenese wordt genoemd. Dit leidt tot een totaal verlies van de nierfunctie. De toename van ECM componenten kan een gevolg zijn van een verhoogde aanmaak in de nier, stapeling van ECM moleculen vanuit de circulatie, een verstoorde afbraak die normaal plaats vindt in het kader van het onderhoud van de ECM, of een combinatie van deze factoren.

Voor de aanmaak van ECM eiwitten maakt de cel gebruik van het transcriptie/translatie systeem. In iedere celkern bevindt zich het genomische DNA dat de code bevat voor het maken van een eiwit. Van een stukje van dit dubbelstrengs DNA wordt een enkelstrengs kopie gemaakt (mRNA) die zich vanuit de celkern naar het cytoplasma verplaatst. Dit proces wordt transcriptie genoemd. Op basis van de code van dit mRNA molecuul wordt door middel van translatie een eiwit gevormd. Het meten van specifieke mRNA moleculen (RNA expressie) in de cel kan dus belangrijke informatie geven over een cel. Dit, samen met het aantonen van de gevormde eiwitten, kan inzicht geven in hoe het proces van fibrogenese verloopt.

In **hoofdstuk 2** zijn studies beschreven over het isoleren van mRNA uit muizen glomeruli, de filtratie eenheden in de nier. Muizen worden vaak als proefdiermodel gebruikt om de ontwikkeling van glomerulosclerose te bestuderen. Voor het isoleren van de muizen glomeruli werd gebruik gemaakt van magnetische retractie. Muizennieren werden hiervoor opgespoten met ijzeroxide deeltjes die specifiek vastlopen in de vaatkluwen van de glomerulus. Vervolgens werd de nier door een zeef geperst waardoor de glomeruli vrij in oplossing kwamen. Door vervolgens deze suspensie tegen een magneet te houden kunnen glomeruli geïsoleerd worden. De vraag bij deze methode was of de mRNA moleculen, die erg gevoelig zijn voor afbraak, deze procedure zouden doorstaan en welke RNA-isolatie methode het meest geschikt was om uit de gezuiverde glomeruli mRNA te isoleren. Uit de experimenten blijkt dat glomeruli isolatie met magnetische retractie in combinatie met de 'LiCl' RNA isolatie methode de beste resultaten gaf. Northernblot hybridisatie experimenten met een probe tegen hoog moleculair mRNA (dat het meest gevoelig is voor afbraak) gaf een positief signaal. Hieruit konden we concluderen dat de LiCl methode het meest geschikt is om mRNA expressie experimenten mee uit te voeren.

De studies in **hoofdstuk 3** beschrijven de distributie van fibronectine isovormen in nierbiopten van patiënten die glomerulosclerose ontwikkelen. Tijdens de transcriptie van DNA, die leidt tot productie van het mRNA, dat codeert voor fibronectine kunnen er bepaalde stukken van de code verwijderd of juist toegevoegd worden (alternatieve splicing). Hierdoor worden eiwit moleculen gevormd waaraan bepaalde domeinen zijn toegevoegd of waaruit die zijn verwijderd. Van het fibronectine molecuul zijn een aantal domeinen bekend die alternatief gespliced kunnen worden: de EDA, de EDB en de V-regio. Inclusie van deze domeinen vindt vooral plaats tijdens de embryogenese waar deze domeinen een belangrijke rol spelen in de proliferatie en differentiatie van cellen. In normale nieren wordt vooral fibronectine gevonden waarin de EDA en EDB domeinen ontbreken. In patiënten die glomerulosclerose ontwikkelen vonden we naast een toename van fibronectine, dat dit fibronectine positief was voor EDA en EDB. Dit zou erop kunnen duiden dat inclusie van deze domeinen een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van glomerulosclerose.

In **hoofdstuk 4** is vervolgens onderzocht of de aanwezigheid van EDA en EDB domeinen van fibronectine tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose konden worden aangetoond op mRNA niveau en welke factoren een rol spelen bij het verschijnen van deze domeinen. In verschillende proefdiermodellen voor glomerulosclerose vonden we alternatieve splicing van EDA en EDB. In muizen met lupus nefritis was dit echter niet aanwezig. Omdat uit eerder onderzoek bekend is dat TGF- β een belangrijke groeifactor is die leidt tot inclusie van het EDA domein, werd de relatie van de aanwezigheid van TGF- β en EDA positief fibronectine bekeken. Hieruit bleek, dat in de diermodellen waarin een toename van TGF- β te zien is ook een inclusie van EDA plaats vindt. In muizen met lupus nefritis, waarin we geen EDA fibronectine kunnen aantonen, vindt ook geen toename van TGF- β plaats. Omdat in deze ziekte het cytokine IL-4 een belangrijke rol speelt, hebben we in gekweekte glomerulaire mesangiale cellen het effect van TGF- β en IL-4 op het splicingspatroon van fibronectine onderzocht. Mesangiale cellen die gekweekt werden met TGF- β lieten inderdaad een toename zien van EDA inclusie, terwijl aanwezigheid van IL-4 juist tot een afname van EDA inclusie leidde. Deze resultaten konden we bevestigen in humane nierbiopten van patiënten met glomerulosclerose. In nierbiopten van patiënten met lupus nefritis was geen toename van TGF- β en EDA fibronectine te zien in vergelijking met gezonde nieren. Uit deze studies concluderen we dat TGF- β een belangrijke rol speelt bij de inclusie van EDA fibronectine, maar dat patiënten ook glomerulosclerose kunnen ontwikkelen zonder een toename van TGF- β en EDA fibronectine.

In **hoofdstuk 5** onderzochten wij de accumulatie van fibronectine vanuit de circulatie in glomerulosclerotische laesies. Uit eerdere studies is gebleken dat er in sclerotische glomeruli van muizen met lupus nefritis grote hoeveelheden van het ECM molecuul fibronectine te vinden zijn, terwijl er op mRNA niveau nauwelijks een toename van fibronectine waarneembaar

is. Als in deze muizen gelabeld fibronectine werd ingespoten, was dit na 24 uur terug te vinden in de laesies. Wij hebben onderzocht via welke bindingsplaatsen het fibronectine vanuit de circulatie gebonden wordt. Hiervoor is het fibronectine molecuul gezuiverd en in kleinere fragmenten geknipt. Ook is onderzocht of de binding van fibronectine in de laesies met heparine voorkomen kon worden. Omdat heparine als een anti-coagulant werkt, en dus via inhibitie van stolling de fibronectine accumulatie zou kunnen remmen, hebben we gekeken of N-desulfated heparine, dat geen anti-coagulante werking meer heeft, de accumulatie van fibronectine kan voorkomen. Uit de accumulatie experimenten met fibronectine is gebleken dat zowel heparine als N-desulfated heparine de accumulatie van fibronectine kon voorkomen. Echter, uit de accumulatie experimenten met de fibronectine fragmenten bleken juist de fragmenten die een lage affiniteit hebben voor heparine te accumuleren in sclerotische laesies. De accumulatie van fibronectine verloopt dus niet via de heparine-bindingsplaats. Omdat heparine de binding wel kan voorkomen, is het waarschijnlijk een bindingsplaats direct naast de heparine-bindingsplaats, die door sterische hindering door heparine wordt afgeschermd.

De studies in **hoofdstuk 6** beschrijven de resultaten van een microarray analyse in glomeruli van patiënten met diabetische nefropathie (DN). DN is een complicatie die optreedt bij ongeveer 30-40% van de patiënten met diabetes en leidt tot verlies van de nierfunctie en de ontwikkeling van glomerulosclerose en interstitiële fibrose. Met behulp van DNA chips is het mRNA expressie patroon van ongeveer 12000 genen bepaald in glomeruli van patiënten met en zonder DN. Door nu te kijken naar de verschillen in expressie tussen controle nieren en nieren met DN kan men inzicht krijgen in de moleculaire processen die een rol spelen in de ontwikkeling van DN. Wij vonden dat een groot aantal genen verschillend tot expressie kwamen. Het betrof o.a. genen die coderen voor eiwitten die zich bevinden in de filtratie complexen tussen de cellen. Opvallend in nieren met DN was de afgenomen expressie van een aantal genen die betrokken zijn bij het in stand houden van de bloedvaten, zogenaamde angiogenetische factoren.

De expressie van de angiogenetische factoren VEGF en CTGF is vervolgens verder onderzocht in een groot aantal nierbiopten van patiënten met verschillende stadia van DN. De resultaten hiervan zijn terug te vinden in **hoofdstuk 7**. Het doel van dit onderzoek was het bevestigen van de microarray resultaten in een groter patiënten cohort en het beantwoorden van de vraag of er een relatie is tussen de expressieniveaus van de angiogenetische factoren en het beloop van de ziekte. Lasercapture microdissectie werd toegepast om glomeruli uit deze biopten te isoleren. VEGF en CTGF niveaus waren significant verlaagd in patiënten met DN. Ook was er een negatieve correlatie tussen VEGF mRNA niveau en het percentage Sirius Red positieve oppervlakte, een maat voor interstitiële fibrose. Het lijkt er dus op dat progressie van de nierziekte gekoppeld is aan afname van VEGF. VEGF wordt in de glomerulus voornamelijk gemaakt door de podocyten. Een verlaging van VEGF zou het gevolg kunnen zijn van podocyt

verlies, iets wat al eerder beschreven is in patiënten met DN. Omdat VEGF een belangrijke factor is voor het in stand houden van endotheelcellen in de glomerulaire capillairen, zou men kunnen speculeren dat het verlies van podocyten in de glomerulus via een afname van de VEGF expressie leidt tot verlies van endotheel. Verlies van endotheel kan leiden tot microangiopathie waardoor uiteindelijk de glomerulaire capillairen verloren gaan. Indien dit mechanisme inderdaad blijkt te bestaan zou het een opening kunnen bieden voor therapeutische interventie zoals het toedien van VEGF of anticoagulantia. Er is echter meer onderzoek nodig om deze hypothese te bewijzen.

