



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Pathways to proteinuria

Khalil, R.

Citation

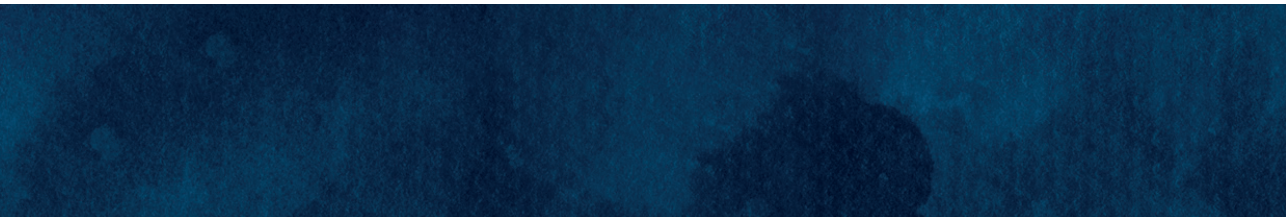
Khalil, R. (2024, June 4). *Pathways to proteinuria*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3762004>

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/1887/3762004>

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



Appendices

Nederlandse samenvatting

Curriculum vitae

List of publications

Dankwoord

Nederlandse Samenvatting

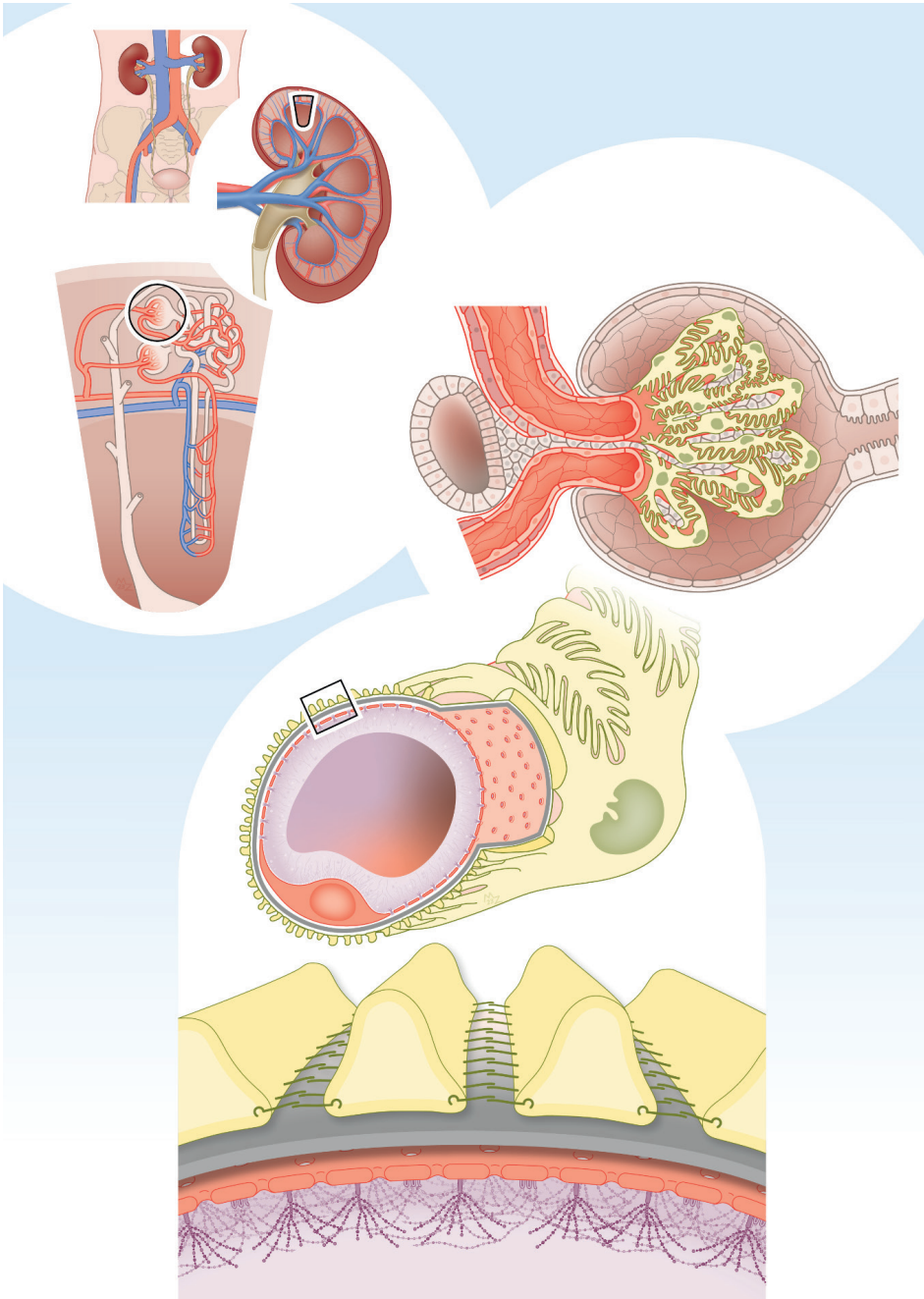
Proteïnurie en chronische nierinsufficiëntie

Proteïnurie, het uitplassen van eiwit in de urine, is een onafhankelijke risicofactor van toename van schade aan de nier, ontwikkelen van cardiovasculaire ziekten en sterfte. In normale, fysiologische omstandigheden hebben mensen geen aanhoudende proteïnurie. Er komt pas eiwit in de urine wanneer deze door de filtereenheid van de nier, de glomerulus, gaat en vervolgens niet wordt opgenomen in de tubulus van de nier. Als een van deze onderdelen beschadigd raakt, kan dat leiden tot proteïnurie.

De glomerulaire filtratiebarrière

In afbeelding 1 wordt een schematisch overzicht getoond van de anatomie van de nier in verschillende niveaus van detail. In de afbeelding links boven is de locatie van de nieren zichtbaar, samen met een dwarsdoorsnede van een nier. Een menselijke nier bevat ongeveer een miljoen functionele eenheden die nefronen worden genoemd. Onder de dwarsdoorsnede van een nier staat een schematische voorstelling van twee nefronen. Elk nefron bestaat uit een capillaire vaatkluwen, of glomerulus, waar de filtratie plaats vindt. Deeltjes die groot zijn of een negatieve lading hebben, passeren minder gemakkelijk dan kleinere deeltjes of deeltjes die positief geladen zijn. De glomerulus wordt begrensd door de glomerulaire filtratiebarrière (GFB), wat de grens vormt tussen het bloed en de pre urine. Rechtsboven is een detail van een glomerulus te zien. In de afbeeldingen daaronder zijn een doorsnede van een capillair en een detail van de GFB weergegeven. Elk vaatkluwen wordt overdekt door gespecialiseerde cellen die de vaatjes bedekken met uitlopers die ook ‘voetuitlopers’ worden genoemd. Daarom heten deze cellen ook wel podocyten, van het Griekse ποδος (voet) en κύτος (container, cel). Tussen deze podocyten en de cellen die het capillair vormen, de glomerulaire endotheelcellen, zit een gel-achtige laag die door beide cellen wordt gemaakt. Dat is de glomerulaire basaalmembraan (GBM). De endotheelcellen van het capillair zijn gespecialiseerde cellen. Ze worden bedekt door een laag met suikerketens (de glycocalyx) en zijn gefenestreerd. In het onderste detail zijn de verschillende lagen zichtbaar die samen de glomerulaire filtratiebarrière (GFB) vormen.

In het onderste detail van afbeelding 1 zijn de aparte lagen van de GFB schematisch weergegeven. Van onder naar boven (of van bloed naar pre urine) zijn dit de glomerulaire endotheliale glycocalyx (paars), gefenestreerde endotheelcellen (rood), glomerulaire basaalmembraan (grijs) en de viscerale epitheelcellen – of podocyten – inclusief de voetuitlopers hiervan (geel/groen).



A

Afbeelding 1. De anatomie van de nier, het nefron, de glomerulus en de glomerulaire filtratiebarrière.

De pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan verschillende met proteïnurie gepaard gaande nierziekten, kunnen ver uiteen liggen. Zo zijn er aandoeningen die vooral gekenmerkt worden door verlittekening van glomeruli, zoals focale segmentale focale glomerulosclerose en diabetische nefropathie. Andere ziektes worden juist weer vooral als auto-immuun aandoeningen geclassificeerd, zoals lupus nefritis en membraneuze nefropathie. Daarnaast zijn er ook verschillende monogenetische aandoeningen die gepaard gaan met proteïnurie. In deze ziektes is er vaak sprake van een podocytopathie of probleem in de tubulaire reabsorptiecapaciteit. Hoewel de onderliggende pathofysiologische mechanismen tussen deze ziektes van elkaar verschillen, kunnen ze toch overlappende kenmerken hebben in de wijze waarop proteïnurie ontstaat.

Gezien proteïnurie een onafhankelijke risicofactor is voor progressie van schade aan de nier, cardiovasculaire ziektes en sterfte, is het verminderen (of voorkómen) van proteïnurie een van de doelen in het behandelen van patiënten met chronische nierinsufficiëntie. De behandeling van chronische nierinsufficiëntie richt zich tot op heden vooral nog op algemeen (cardio)vasculair risicomangement, zoals het verlagen van de bloeddruk en het cholesterol, maar er is nog geen behandeling die zich specifiek op de proteïnurie richt. Om dat mogelijk te kunnen maken, is een beter begrip vereist van de mechanismen die leiden tot het ontstaan van proteïnurie. In dit proefschrift wordt een combinatie van experimenten in celkweek, experimentele diermodellen, histopathologisch onderzoek en een patiënt cohort onderzoek toegepast om de paden leidend tot proteïnurie verder te onderzoeken.

Nefropathische cystinose

In hoofdstuk 2 wordt een experimenteel zebravissenembryo model van de erfelijke aandoening 'nefropathische cystinose' geïntroduceerd. Nefropathische cystinose is een monogenetische aandoening. Een mutatie in het *CTNS* gen leidt tot stapeling van cystine in lysosomen, wat kristalvorming en schade aan weefsels veroorzaakt. Zonder behandeling is nefropathische cystinose een dodelijke aandoening. De behandeling is nu nog beperkt tot het gebruik van cysteamine. Dit middel voorkomt nieuwe schade, maar kan bestaande schade niet herstellen. Daarnaast kent het vele bijwerkingen, zoals misselijkheid, braken en diarree. Het hier geïntroduceerde model van een zebravisembryo met homozygote *ctns* mutatie vertoont veel overeenkomsten met het fenotype van nefropathische cystinose in de mens. De gemuteerde zebravissenembryo's ontwikkelen stapeling van cystine, vertraagde ontwikkeling en glomerulaire en tubulaire dysfunctie. Behandeling met cysteamine kon deze schade deels voorkomen. Hiermee wordt aangetoond dat dit een geschikt experimenteel model is voor het onderzoeken van de pathofysiologie en eventuele nieuwe behandelingen van nefropathische cystinose.

Heparan sulfaat glycosaminoglycanen

In hoofdstukken 3 en 4 worden heparan sulfaat glycosaminoglycanen onderzocht. Heparan sulfaat glycosaminoglycanen (HS-GAG) bestaan uit aggregaten van negatief geladen, gesulfateerde suikerketens die vastzitten aan een kerneiwit. Deze aggregaten bevinden zich in de glomerulaire basaalmembraan en glycocalyx. Verschillende enzymen en co-polymerases zijn vereist om HS-GAG te kunnen vormen, waaronder EXT1 en EXT2. Lang werd gedacht dat HS-GAG essentieel is voor het behoud van de barrière in de glomerulus. De hypothese was dat dit zowel door hun vorm als negatieve lading kwam. Recente studies trekken deze theorie echter in twijfel. In hoofdstuk 3 en 4 wordt beschreven dat mutaties in genen die essentieel zijn voor de vorming van HS-GAG niet leiden tot proteïnurie. Hoofdstuk 3 gebruikt hiervoor het *dackel* zebravissenembryo model. De in dit model onderzochte zebravis embryo's hebben een homozygote kiembaan mutatie in 1 van 2 co-polymerases die essentieel zijn in de vorming van HS-GAG. Ondanks dat de hoeveelheid negatieve lading in de glomerulaire basaalmembraan verminderd is, wordt er in dit model geen proteïnurie geobserveerd. In hoofdstuk 4 wordt de rol van HS-GAG verder onderzocht in patiënten met het autosomaal dominant overervende ziektebeeld van 'multipale osteochondromen,' voorheen ook bekend als hereditaire multipale exostosen. Mensen met deze aandoening hebben in meer dan 85% van de gevallen een heterozygote kiembaan mutatie in het EXT1 of EXT2 gen. De ziekte wordt gekenmerkt door de vorming van meerdere osteochondromen. In hoofdstuk 4 wordt in een dwarsdoorsnede onderzoek van mensen met multipale osteochondromen aangetoond dat zij niet vaker proteïnurie of veranderingen aan de glycocalyx hebben dan mensen zonder multipale osteochondromen. Ook wordt in dit hoofdstuk een historisch cohortonderzoek beschreven. Dit cohort bestaat uit patiënten die ooit een resectie van een osteochondroom en nierbiopt hebben gehad. De pathologieverslagen en nierbiopten van deze patiënten zijn opnieuw onderzocht en er werden geen specifieke glomerulaire morfologische afwijkingen gezien. Wel werd in 1 patiënt een beeld gezien dat past bij een eerder beschreven casus van 'MO glomerulopathie', bestaande uit depositie van fibrillen. De zeldzame casus van MO glomerulopathie worden toegeschreven aan lokaal verlies van heterozygositeit.

De resultaten van hoofdstukken 3 en 4 komen overeen met andere studies waaruit blijkt dat verlies van HS-GAG niet leidt tot verlies van integriteit van de glomerulaire filtratiebarrière, ondanks dat er wel verlies is van negatieve lading.

Dynamin en GTPases

Dynamin is wellicht een van de meest veelbelovende potentiële therapeutische doelen voor de behandeling van proteïnurie. Dynamin is een eiwit dat vooral bekend is in

clathrin-gemedieerde endocytose en afsplitsing van vesikels in de synapsspleet. Deze processen zijn veel onderzocht in neuronen. Dynamin is een GTPase dat een helix-vormige polymeer om de hals van afsplitsende vesikels kan vormen om deze te splitsen van de onderliggende membraan. Van dynamin is beschreven dat het in de nier betrokken is bij de verwerking van nephrin, directe interactie met het cytoskelet van de podocyt via actin en actin-reguleerde eiwitten en in endocytose van albumine door podocyten. De functie van dynamin hangt af van de vorm, of staat van oligomerizatie, waar het zich in bevindt. Daarnaast kan dynamin inactief gemaakt worden door Cathepsin L. In twee recente studies wordt in verschillende experimentele proteïnurische diermodellen Bis-T-23 gebruikt als behandeling. Bis-T-23 stimuleert het oligomerizeren van dynamin. In deze experimenten leidde toediening van dit middel tot minder proteïnurie.

In hoofdstuk 5 wordt beschreven dat expressie van dynamin en Cathepsin L verhoogd is in patiënten met proteïnurische nierziekten. Ook wordt in een experimenteel model met een spontaan proteïnurische rat aangetoond dat de expressie van dynamin al verhoogd is voordat er proteïnurie optreedt. Deze resultaten ondersteunen de hypothese dat dynamin een beschermende rol heeft in de glomerulaire filtratiebarrière en een veelbelovend aangrijpingspunt is voor het behandelen van proteïnurie.

Transmembrane protein 14A

In hoofdstuk 6 wordt transmembrane protein 14A (TMEM14A) beschreven als een essentieel onderdeel van de glomerulaire filtratiebarrière. Van TMEM14A is bekend dat het mogelijk betrokken is bij het voorkomen van Bax-gemedieerde apoptose. Verder is het een relatief onbekend eiwit. In dit onderzoek wordt TMEM14A geïdentificeerd in de spontaan proteïnurische rat die ook in hoofdstuk 5 gebruikt is. Het lijkt vooral tot expressie te komen in podocyten. De expressie van TMEM14A blijkt significant lager te zijn in spontaan proteïnurische ratten dan in niet-proteïnurische ratten. Dit is al het geval voordat er proteïnurie optreedt. In een zebravissenembryo knockdown model wordt de translatie van de zebravissen homoloog van TMEM14A geblokkeerd, wat leidt tot verhoogde permeabiliteit van de glomerulaire filtratiebarrière. Vervolgens wordt aangetoond dat TMEM14A expressie verlaagd is in verschillende proteïnurische nierziekten in mensen, behalve bij diabetische nefropathie.

De resultaten van dit hoofdstuk introduceren TMEM14A als een element dat van belang is voor het intact houden van de glomerulaire filtratiebarrière. Meer onderzoek is nodig om vast te stellen hoe dit effect tot stand komt en of dit potentieel van andere factoren afhankelijk is.

Conclusie

Het doel van het onderzoek in dit proefschrift is om de paden leidend tot proteïnurie verder in kaart te brengen. De glomerulaire filtratiebarrière is niet een statische zeef. Het is een dynamisch gereguleerde machine, waarbij de verschillende onderdelen van zowel de filtratiebarrière als de tubulaire reabsorptie samenwerken. Het vergroten van het begrip van deze samenwerkende onderdelen zal de sleutel zijn tot het identificeren en ontwikkelen van nieuwe gerichte behandelingen van proteïnurie, die hopelijk zullen leiden tot een lagere ziektelast en betere gezondheid van onze patiënten.