

Nederlandse samenvatting

Veel patiënten met een chronische nierziekte bereiken uiteindelijk eindstadium nierfalen: het moment waarop dialyse of een niertransplantatie noodzakelijk is om te overleven. Het aantal patiënten met eindstadium nierfalen is in de laatste decennia aanzienlijk gestegen, zowel in Nederland als in andere Westerse landen. Deze toename is enerzijds te wijten aan de vergrijzing en anderzijds te danken aan de verbeterde prognose voor deze patiënten wat betreft sterfte aan hart- en vaatziekten. Het is echter te verwachten dat in de nabije toekomst het aantal patiënten met eindstadium nierfalen nog verder zal toenemen.

De ontwikkeling van nieuwe medicatie, zogenaamde angiotensine convertering enzyme (ACE) remmers en angiotensine II type 1 (AT1) receptor blokkers, hebben voor veel patiënten geleid tot uitstel van achteruitgang van de nierfunctie. In dierproeven is zelfs herstel van nierschade tengevolge van deze medicatie aangetoond. Echter, ondanks de beschikbaarheid van ACE remmers en AT1 blokkers nemen de aantallen dialyse- of transplantatiebehoefte patiënten dus juist toe. Het is duidelijk dat nieuwe (of aanvullende) therapieën nodig zijn. Hiertoe is het nodig om in de nier aanwezige factoren, die betrokken zijn bij nierschade en als doelwit voor interventie kunnen dienen, te identificeren.

De belangrijkste huidige geneesmiddelen zijn gericht tegen stoffen die zich (voornamelijk) aan de buitenzijde van de cel bevinden, bijvoorbeeld het enzym ACE of de AT1 receptor. In dit proefschrift is onderzoek gedaan naar de rol van proteïne kinases, specifieke boodschappermoleculen die zich *binnenin* cellen bevinden, in nierziekten. Een centrale vraag hierbij was of het remmen van deze signaalmoleculen invloed heeft op het verloop van nierschade.

In **deel I** wordt een overzicht gegeven van de verschillende functies van proteïne kinases in de nier, zowel in de gezonde als in de zieke nier; tevens wordt besproken hoe deze kunnen worden onderzocht. Proteïne kinases zijn signaalmoleculen die 'boodschappen' van buiten de cel (bijvoorbeeld binding van een eiwit aan een receptor) kunnen omzetten in bepaalde acties

binnenin de cel (zoals het activeren van bepaalde genen in de celkern). Op deze manier spelen proteïne kinases een belangrijke rol in de normale celhuishouding.

Een belangrijke en relatief veel onderzochte groep proteïne kinases zijn de zogenaamde mitogen-activated protein kinases (MAP kinases). De functies van de verschillende MAP kinases (p38, ERK en JNK) in de nier worden uitgebreid beschreven in **hoofdstuk 2**. MAP kinases kunnen, zoals alle proteïne kinases, worden geactiveerd door middel van fosforylatie (toevoegen van een fosforgroep). MAP kinases komen uitgebreid in de nier voor, in alle celtypen die aanwezig zijn in de nier (bijvoorbeeld endotheelcellen, epitheelcellen en mesangiumcellen). Evenzo kunnen ze door zeer veel verschillende stimuli (bijvoorbeeld groeifactoren, cytokines of hormonen) worden geactiveerd. Nadat ze worden geactiveerd kunnen MAP kinases op hun beurt andere kinases activeren, maar ze kunnen zich ook naar de celkern verplaatsen, alwaar ze (via transcriptiefactoren) de expressie van diverse genen kunnen reguleren. Op deze manier kan MAP kinase activatie bijvoorbeeld leiden tot het in gang zetten van een ontstekingsreactie, of tot celdeling.

Onder normale omstandigheden spelen MAP kinases een belangrijke rol in de regulatie van allerlei fysiologische ('normale') processen. In de zieke nier echter blijken sommige MAP kinases een sterk verhoogde activiteit te vertonen. Dit zou erop kunnen wijzen dat het remmen van de activiteit van deze kinases mogelijk therapeutische effecten zou kunnen hebben. Door toepassing van recent ontwikkelde MAP kinase remmers bleek inderdaad dat op deze manier nierschade geremd kan worden.

Doordat proteïne kinases verschillende andere soorten kinases kunnen activeren ontstaan op deze manier complexe netwerken, zogenaamde 'pathways'. Interacties tussen verschillende kinases (of verschillende kinase pathways), komen zeer vaak voor en zorgen er bijvoorbeeld voor dat bij het uitvallen van een kinase (of pathway) via een andere weg compensatie optreedt. Deze interacties kunnen echter ook negatieve gevolgen hebben. Zo zijn er bijvoorbeeld gevallen beschreven waarin in een proefdiermodel voor nierschade één kinase werd geremd, waardoor een andere kinase sterk bleek te worden geactiveerd, hetgeen tot verergering van nierschade leidde. Vanwege de onderlinge interacties tussen kinases lijkt het

zinnig om, in plaats van één specifieke kinase, een of meerdere pathways tegelijk te onderzoeken.

In de afgelopen jaren hebben zogenaamde arraytechnieken, met name op het gebied van genomics (onderzoek naar genen en genexpressie), een sterke vlucht genomen. De arraytechnologie maakt het mogelijk om in één sample duizenden genen tegelijkertijd onder gelijke omstandigheden te bestuderen. Uit duizenden genen kan zo een selectie worden gemaakt van enkele genen die het meest interessant zijn: de kandidaat genen. Deze kunnen vervolgens apart worden geanalyseerd. Analog aan deze techniek is recent een kinase array ontwikkeld die het mogelijk maakt om de activiteit van 1100 kinases tegelijkertijd te bestuderen. In **hoofdstuk 3** wordt beschreven hoe deze kinase array kan worden gebruikt om de kinase-activiteit in nierweefsel te screenen. We hebben deze techniek toegepast in het homozygote Ren2 model, een transgeen ratmodel dat wordt gekenmerkt door een sterk geactiveerd renin-angiotensine systeem, een ernstig verhoogde bloeddruk en nierschade. Van een aantal proteïne kinases, waaronder p38 MAP kinase en PDGFR β , kon met behulp van de array worden vastgesteld dat ze een verhoogde activiteit vertoonden in de nieren van Ren2 ratten ten opzicht van controledieren. Behandeling met een ACE remmer, een interventie die de nieren beschermt, leidde tot verminderde activatie van beide genoemde kinases. Met behulp van conventionele technieken (die normaliter worden gebruikt om de activiteit van één kinase aan te tonen) konden deze verschillen tussen de groepen bevestigd worden. Aangezien in andere studies reeds is aangetoond dat remming van p38 MAP kinase of PDGFR β nierschade inderdaad kan reduceren, is het waarschijnlijk dat deze kinases een rol spelen in de ontwikkeling van nierschade in dit model. Hieruit blijkt dat onze kinase array geschikt is om (groepen van) kinases in nierweefsel te identificeren die kandidaat zijn voor een relevante rol in nierschade. Gezien de complexiteit van de signaalnetwerken in de nier lijkt deze nieuwe techniek belangrijke implicaties te hebben voor toekomstig onderzoek naar proteïne kinases.

Hoewel toegenomen activiteit van een bepaalde kinase zou kunnen suggereren dat deze een rol speelt in nierziekten dient dit bewezen te worden doordat specifieke remming van (de activiteit van) deze kinase reductie van nierschade bewerkstelligt. **Deel II** behandelt de

effecten van interventie met specifieke MAP kinase remmers (i.e. specifieke remming van respectievelijk ERK, p38 en JNK) in nierziekten.

In de **hoofdstukken 4 en 5** hebben we onderzocht of remming van ERK of p38 schade aan de glomeruli (de minuscule filtereenheden in de nier), respectievelijk het tubulointerstitium (het buizensysteem waar de urine wordt gevormd uit het glomerulaire filtraat door opname en teruggave van allerlei stoffen, en het tussenliggende weefsel), in het homozygote Ren2 model zou kunnen voorkomen. Het Ren2 model wordt gekarakteriseerd door een sterk geactiveerd renine-angiotensine systeem - aangezien ERK en p38 worden geactiveerd als de AT1 receptor (een belangrijke component van dit systeem) wordt geactiveerd blijkt het Ren2 model een geschikt model voor deze vraagstelling. Zowel ERK als p38 remming leidde tot reductie van glomerulaire schade (bijvoorbeeld expressie van het eiwit desmine en mesangiale matrix expansie, respectievelijk markers voor schade aan podocyten en mesangiumcellen, twee zeer belangrijke cellen in de glomerulus). Daarnaast reduceerde p38 remming de productie van α -gladde spiercel actine in het tubulointerstitium en de productie van osteopontine en Kidney injury molecule-1 (Kim-1) door tubulus epitheelcellen, evenals interstitiële fibrose. Deze effecten verliepen onafhankelijk van de bloeddruk. Tezamen suggereren deze bevindingen dat remming van ERK en p38 nierschade kan reduceren.

De rol van de MAP kinase JNK is nader onderzocht in de **hoofdstukken 6 en 7**. De functie van de MAP kinases ERK en p38 in de nier is tot nu toe vrij uitgebreid onderzocht, maar er is veel minder bekend over JNK. In **hoofdstuk 6** wordt de aanwezigheid van JNK in nierweefsel van patiënten met verschillende nierziekten onderzocht en vergeleken met nierweefsel van mensen zonder nierziekte. In het nierweefsel van patienten vonden we dat JNK sterk geactiveerd is in glomerulaire en tubulaire cellen. De mate van tubulaire JNK activatie correleerde met verschillende parameters van nierschade. Zo was de mate van JNK activatie sterker naarmate de nierfunctie slechter was, en naarmate er meer ontstekingscellen aanwezig waren in de nier. In het gezonde menselijk nierweefsel werd nagenoeg geen JNK activatie gevonden. Dit suggereert dat JNK activatie een rol speelt bij nierschade bij de mens.

Om te onderzoeken of JNK ook daadwerkelijk een functionele rol speelt in nierziekten, hebben we JNK verder bestudeerd in dier-experimentele modellen voor nierschade. In het unilaterale renale ischemie/reperfusiemodel wordt onder narcose de linker nierslagader van een gezonde rat gedurende 45 minuten afgeklemd (ischemie), waarna de klem weer wordt verwijderd (reperfusie). Deze onderbreking van de bloedstroom door de nier leidt tot zuurstof gebrek in het nierweefsel, met als gevolg nier-beschadiging. Reeds 30 minuten na de reperfusie vonden we toegenomen JNK activatie in tubuluscellen in de beschadigde nier. Ook de activiteit van c-Jun, een belangrijke transcriptiefactor die door JNK kan worden geactiveerd, was sterk toegenomen. Via transcriptiefactoren zoals c-Jun kunnen allerlei genen (kleine stukjes DNA) worden geactiveerd, wat resulteert in toegenomen vorming van specifieke eiwitten. Eiwitten op hun beurt zijn cruciale bouwstenen, maar spelen ook een doorslaggevende rol in communicatie tussen cellen. De activatie van JNK en c-Jun activatie was sterker naarmate er meer ontstekingscellen werden gevonden in de nier. Dit wijst erop dat de JNK pathway betrokken kan zijn bij ontsteking. Specifieke remming van JNK in het ischemie/reperfusiemodel remde renale c-Jun activatie, expressie van MCP-1 (monocyte chemoattractant proteïn-1, een ontstekings-eiwit) en de hoeveelheid ontstekingscellen, zowel 4 als 15 dagen na inductie van ischemie/reperfusie. Dit vormt een belangrijk argument voor een rol voor JNK in ontsteking in de nier. In gekweekte tubulusepitheelcellen bleek JNK remming ook de expressie van MCP-1 sterk te remmen. MCP-1 is een van de voornaamste stoffen die betrokken is bij het aantrekken van macrofagen (bepaalde ontstekingscellen) naar beschadigde gebieden in de nier. Samengevat: wanneer er schade optreedt in de nier (bijvoorbeeld zuurstofgebrek) wordt JNK geactiveerd, met name in tubuluscellen. JNK activatie lijkt te leiden tot MCP-1 expressie in tubuluscellen, waardoor macrofagen worden aangetrokken die een ontstekingsreactie veroorzaken. Deze ontstekingsreactie is cruciaal in de latere ontwikkeling van verlittekening (fibrose) in de nier, welke uiteindelijk tot achteruitgang van de nierfunctie kan leiden.

De rol van de transcriptiefactor c-Jun, met name in humane nierschade, is verder uitgewerkt in **hoofdstuk 7**. In nierbiopten van een groot aantal patiënten met verschillende nierziekten bleek c-Jun sterk geactiveerd te zijn, in tegenstelling tot in gezond nierweefsel. Om te onderzoeken via welk(e) mechanisme(n) c-Jun activatie zou kunnen leiden tot nierschade

werd c-Jun activatie geremd met de JNK remmer SP600125 in gekweekte humane tubulus epitheelcellen. Remming van c-Jun activatie met SP600125 leidde tot reductie van de expressie van MCP-1 en procollageen-1 α 1. Dit suggereert dat c-Jun betrokken zou kunnen zijn bij (respectievelijk) ontsteking en fibrose. Opmerkelijk was dat ook in patiënten met minimal change disease, een ziektebeeld zonder duidelijke afwijkingen in het nierbiopt maar wel met forse proteïnurie (eiwittek) c-Jun was geactiveerd. Dit zou kunnen betekenen dat proteïnurie op zich (zonder nierschade) al c-Jun kan activeren, maar ook dat c-Jun activatie op zich nog niet direct tot nierschade hoeft te leiden. Wat de klinische betekenis van c-Jun activatie op de langere termijn is, dient verder te worden onderzocht.

Concluderend kan worden gesteld dat, hoewel het toedienen van MAP kinase remmers aan patiënten momenteel nog niet aan de orde is, de studies in dit proefschrift aantonen dat remming van proteïne kinases (en specifiek MAP kinases) in diermodellen nierschade zou kunnen remmen. Verdere studies naar de functie van MAP kinases in de gezonde en zieke nier zijn nodig; dit zou in de toekomst kunnen leiden tot nieuwe mogelijkheden voor interventie, gericht tegen progressie van nierschade.