

## Samenvatting goedgekeurd eindverslag

Juni 2009

|   |
|---|
| <b>Titel:</b><br>Towards humanized rat kidneys. A baculovirus mediated expression system as a new strategy for gene expression / silencing in rat kidneys   |
| <b>Projectcode:</b> 2149  |
| <b>Projectleider(s):</b><br>Dr. R. Masereeuw, dr. J.B. Koenderink, Dept. of Pharmacology and Toxicology, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University Nijmegen Medical Centre  |
| <b>Samenwerking:</b>  |
| <b>Programma:</b><br>Open Onderzoeksprogramma (eerste ronde 2009)<br>Onderzoekslijn: nierziekten, werking<br>Soort: dieronderzoek; toegepast, niet-klinisch<br>Onderwerp: transporteiwitten (kanalen), gehumaniseerd diermodel  |
| <b>Doel:</b><br>Het ontwikkelen van ratmodellen die menselijke genen van transporteiwitten in de nieren tot uitdrukking brengen. Overdracht van een gen verloopt via baculovirussen. Dit maakt het onderzoeken van de werking van menselijke transporteiwitten in de nieren in een proefdieren in vivo mogelijk. Uiteindelijk betere behandeling van ziekten die een gevolg zijn van afwijkingen in de transporteiwitten in de nieren.  |
| <b>Samenvatting:</b><br>De nieren zijn opgebouwd uit kleine eenheden, nefronen, elk bestaand uit een nierfiltertje en een nierbuisje. De nierfiltertjes scheiden een grote hoeveelheid voorurine uit die voor het merendeel terug opgenomen wordt in de nierbuisjes (reabsorptie). Transporteiwitten (of kanalen) in de membranen van cellen in de nierbuisjes zijn in staat de gepaste hoeveelheden water en zouten terug op te nemen voor beheersing van de bloeddruk. Transporteiwitten in de nieren verplaatsen ook giftige stoffen uit het bloed naar de urine. Niet goed werkende transporteiwitten, bv. door genetische oorzaken, zijn betrokken bij veel nierziekten.<br>Op het niveau van moleculen, cellen en organen is er al veel onderzoek verricht naar transporteiwitten, maar nog weinig in een diermodel van een compleet organisme, wat meer inzicht zou geven in de werking van de transporters. Dit komt doordat de genen in proefdieren (ratten, muizen) niet allemaal een menselijke tegenhanger hebben (bv. het transporteiwit Oatp in het nierbuisje van de rat), en doordat sommige dierlijke transporteiwitten veel meer tot expressie komen dan het vergelijkbare menselijk eiwit in de mens (bv. het transporteiwit BCRP dat giftige stoffen uit cellen pompt, zoals medicatie bij borstkanker). Knockout-muizen, waarbij een bepaald (dierlijk) gen uitgeschakeld is, hebben nadelen als ontwikkelingsstoornissen en een te kleine overeenkomst tussen het menselijke met het dierlijke gen.<br>Om de werking van menselijke genen in dieren te bestuderen willen de onderzoekers diermodellen ontwikkelen die gebaseerd zijn op het overbrengen van menselijke genen (transfectie) met baculovirussen. Deze virussen leven in ongewervelde dieren, bv. insecten. Een baculovirus kan cellen van zoogdieren wel binnengaan maar is niet in staat zich in die cellen voort te planten. Het virus wordt daarom breed toegepast voor het overbrengen van menselijke genen op dierlijke cellen in vitro (buiten het lichaam). Het gen wordt eerst in het virus ingebracht, vervolgens besmet het virus de cellen en brengt het gen over in het cel-DNA. De onderzoeksgroep is er als eerste in geslaagd om een gen via een baculovirus in rattenieren in vivo (dus in het dier zelf) tot uitdrukking te brengen. De hypothese is dat het baculovirussysteem geschikt is om diermodellen met menselijke transporteiwitten in de nieren te ontwikkelen.<br>Het gaat om drie diermodellen. Ten eerste, het overbrengen van het menselijk MR2P-gen in ratten die het rat-Mr2p-gen missen (multidrug resistance protein, een eiwit dat giftige stoffen uit de cel verwijdert). De werking van het gen wordt getest in uitgenomen nieren (perfusiemodel). Ten tweede, het FXYD2-gen, een onderdeel |

van een transporteiwit in de nieren. Speciaal overexpressie van de G41R-mutatie van het gen, die waarschijnlijk verantwoordelijk is voor magnesiumdeficiëntie door te hoge uitscheiding van magnesium. Meting daarvan kan aantonen of de mutatie inderdaad de oorzaak is. Ten derde, vervanging van het Oatp1-transporteiwit in de rattennier door het menselijk OATP1A2-gen (eiwitten in de nierbuisjes die giftige stoffen uitscheiden). Activiteit van het eigen Oatp1-gen in de rat wordt daarbij stilgelegd met RNA-interference (RNAi, hierbij hechten korte complementaire RNA-moleculen zich aan kopieën van het gen waardoor de cel dat niet meer kan aflezen). Het project is gefinancierd voor de eerste vraag.

#### **Looptijd:**

Aanvraag: 2005

Periode: 1 april 2006 - 1 april 2008

Duur: 2 jaar

Eindverslag: 13 februari 2009

#### **Toegekende subsidie:**

#### **Resultaten en conclusies:**

##### **Resultaten**

Het overbrengen van MR2P. Een baculovirus werd ontwikkeld dat het menselijk MR2P-gen tot uiting brengt. Bovendien brachten de onderzoekers twee genen in van het Epstein-Barr virus, waarvan bekend is dat die het tot uitdrukking brengen van vreemde genen in cellen van zoogdieren bevordert. Vervolgens is het virus getest op cellijnen. Overdracht van MR2P in de menselijke embryonale niercellijn HEK293 slaagde (het gen kwam tot uiting en werkte goed). Overdracht in een cellijn van niercellen van de rat ging ook goed (GERP-celijn, cellen die niet zelf het Mr2p-gen hebben). Vervolgens is het virus getest op nieren in de rat. Het virus bracht een controle-gen goed over in de nierbuisjes, maar overdracht van het MR2P-gen kon niet worden aangetoond. Kennelijk is het baculovirus-systeem nog niet geschikt voor het overbrengen van genen van eiwitten in de celmembraan (zoals transporteiwitten).

##### **Conclusie**

Onderwerp is het ontwikkelen van een diemodel met menselijke transporteiwitten in de niercellen met behulp van gen-overdracht door het baculovirus.

Een virus is ontwikkeld dat het menselijke MR2P-gen tot uitdrukking brengt (multidrug resistance proteïn, een transporteiwit dat giftige stoffen uit de cel verwijdert). Het virus slaagde erin het gen over te brengen in een lijn van menselijke niercellen en in een lijn van niercellen van de rat. Overdracht van het gen in de nier in een ratmodel lukte echter niet. Waarschijnlijk moet het baculovirus-model eerst worden verbeterd om ook genen voor eiwitten in celmembranen, zoals transporteiwitten, goed over te brengen naar cellen van proefdieren.

#### **Implementatie en vervolg:**

Verder onderzoek en ontwikkeling aan het baculovirus-model. Ontwikkeling van een model dat menselijke transporteiwitten goed overbrengt in een proefdier.

Ontwikkeling van diemodellen waarin menselijke transporteiwitten tot uiting komen. Onderzoek met die modellen naar de mechanismen van ziekten met een verstoorde werking van een transporteiwit in de nieren.

#### **Publicaties, incl. promotie en proefschrift, octrooi:**

**Publicaties:** 1 artikel ingezonden; 2 artikelen in voorbereiding.

**Promotie:** niet