

C.D. Cohen<sup>1</sup> · M. Kretzler<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Klinik für Nephrologie und Institut für Physiologie mit Zentrum für integrative Humanphysiologie, Universitätsspital und Universität Zürich

<sup>2</sup> Department of Medicine, University of Michigan, Ann Arbor

# Genexpressionsanalysen an Nierenbiopsien

## Die Europäische Renale cDNA Bank – Kröner-Fresenius Biopsiebank

Die lichtmikroskopische, immunhistologische und elektronenmikroskopische Untersuchung von Nierenbiopsien stellt den diagnostischen Goldstandard in der Nephrologie dar. In der täglichen Praxis sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen und ihre Interpretation richtungweisend für viele klinische Entscheidungen. Es sind hierbei überwiegend morphologische Veränderungen, die den Nephrologen bei seinen Therapieentscheidungen leiten.

In Zeiten der „-omic-Technologien“ – Genomics für umfangreiche Genexpressionsanalysen, Proteomics für Untersuchung von Hunderten von Eiweißen, u. a. – und in der Ära der Systembiologie sollten neue Methoden einen umfassenderen Informationsgewinn aus Nierenbiopsie-Gewebe möglich machen. Das Ziel ist die genauere Abbildung der biologischen Prozesse, die dem Krankheitsprozess zugrundeliegen. Sollten sich hiermit Informationen gewinnen lassen, die Prognosen zum klinischen Verlauf zuließen oder Differenzialdiagnosen trennen können, so wäre ein großer Schritt zur spezifischeren Therapie und individualisierten Patientenbetreuung getan.

Vor zehn Jahren, als sich die Möglichkeiten der Genexpressionsanalyse abzeichneten, schlossen sich mehrere europäische Nephrologiezentren zu einem

Konsortium zusammen, der Europäischen Renalen cDNA Bank (ERCB)<sup>1</sup>. Ziele dieses gemeinschaftlichen Projektes waren:

- Verbesserung des Verständnisses der Mechanismen von humanen Nierenerkrankungen,
- Identifizierung von diagnostischen und prognostischen Markern in Nierenbiopsien und
- Bereicherung der nephrologischen Forschung durch translationelle Untersuchungen, d. h. der Überprüfung von Befunden aus der Grundlagenforschung auf deren Relevanz für die Krankheitsprozesse im Menschen.

Im Folgenden sollen Ergebnisse und Erkenntnisse aus dieser einzigartigen Kooperation berichtet werden.

### Methoden und Auswertung

Zwei Methoden haben sich in den letzten Jahren etabliert, um zu untersuchen, welche Gene in einem Gewebe transkribiert werden: Die quantitative Real-time-RT (Reverse Transkriptase)-

PCR (Polymerasekettenreaktion) und die Microarrays. Erstgenannte Methode ist sehr sensitiv, durch Amplifikation können auch geringste Mengen einer spezifischen Nukleinsäuresequenz quantifiziert werden [8]. Microarrays erlauben die gleichzeitige Untersuchung tausender cDNAs [13]. Unter Einbeziehung klinischer Daten in die weitere Analyse kann es gelingen, das Expressionsmuster bestimmter Gene mit dem klinischen Verlauf oder dem Therapieansprechen zu korrelieren.

#### Infobox: Aktive Zentren der Europäischen Renalen cDNA Bank – Kröner-Fresenius Biopsiebank seit Gründung des Konsortiums

M. Fischereder, H. Schmid, L. Weber, D. Schlöndorff, München; J.D. Sraer, P. Ronco, Paris; M.P. Rastaldi, G. D'Amico, Mailand; P. Doran, H. Brady, Dublin; D. Mönks, C. Wanner, Würzburg; A.J. Rees, Aberdeen; F. Strutz, G.A. Müller, Göttingen; P. Mertens, J. Floege, Aachen; N. Braun, T. Risler, Tübingen; L. Gesualdo, F.P. Schena, Bari; J. Gerth, G. Stein, G. Wolf, Jena; R. Oberbauer, D. Kerjaschki, Wien; B. Banas, B.K. Krämer, Regensburg; M. Saleem, Bristol; H.P. Marti, R.P. Wüthrich, Zürich; W. Samtleben, München; H. Peters, H.H. Neumayer, Berlin; M. Daha, Leiden; K. Ivens, C. Blume, B. Grabensee, Düsseldorf; F. Mampaso (†), Madrid; J. Oh, F. Schaefer, M. Zeier, H.J. Gröne, Heidelberg; P. Gross, Dresden; G. Tonolo; Sassari; V. Tesar, Prag; H. Rupperecht, Bayreuth

<sup>1</sup> Aus Wertschätzung für die umfassende Unterstützung des Projektes durch die Else Kröner-Fresenius-Stiftung erfolgte im Jahr 2006 die Umbenennung der ERCB in „Europäische Renale cDNA Bank – Kröner-Fresenius Biopsiebank“.

Hier steht eine Anzeige.



Nephrologe 2008 · 3:190–194  
DOI 10.1007/s11560-008-0164-9  
© Springer Medizin Verlag 2008

C.D. Cohen · M. Kretzler

### Genexpressionsanalysen an Nierenbiopsien. Die Europäische Renale cDNA Bank – Kröner-Fresenius Biopsiebank

#### Zusammenfassung

Die Nierenbiopsie und deren histologische Aufarbeitung sind klinische Routine und diagnostischer Goldstandard in der Nephrologie. Neue Methoden ermöglichen an dem gewonnenen Material neben der etablierten Diagnostik auch die umfassende Analyse der Genexpression. Anhand von Ergebnissen einer europäischen Multicenterstudie zur Genexpressionsanalyse an Nierenbiopsien wird gezeigt, dass dieser moderne Ansatz nicht nur die sogenannte Grundlagenforschung bereichert, sondern in Zukunft die Biopsiediagnostik ergänzen könnte. Die Ziele sind hierbei erweiterte Diagnosestellung, spezifischere Therapieentscheidung und individuelle Prognoseabschätzung.

#### Schlüsselwörter

Nierenbiopsie · Nierenerkrankungen · Genexpression · Biomarker · Diagnostische Tests

### Gene expression analyses of kidney biopsies. The European Renal cDNA Bank – Kröner-Fresenius Biopsy Bank

#### Abstract

Histological analysis of kidney biopsies is an essential part of our current diagnostic work-up of patients with renal disease. Besides the already established diagnostic tools, new methods allow extensive analysis of the sample tissue's gene expression. Using results from a European multicenter study on gene expression analysis of renal biopsies, in this review we demonstrate that this novel approach not only expands the scope of so-called basic research but also might supplement future biopsy diagnostics. The goals are improved diagnosis and more specific therapy choice and prognosis estimates.

#### Keywords

Needle biopsy · Kidney diseases · Gene expression profiling · Biomarker · Diagnostic test

Entscheidend für beide Methoden ist die hohe Qualität des Untersuchungsmaterials, der mRNA, und das Vermeiden von unspezifischen Veränderungen der mRNA-Expression vor der Analyse. Für die ERCB wurde ein Asservierungs- und Aufarbeitungsprotokoll entwickelt, das für den Kliniker sehr einfach anzuwenden ist und für die speziellen Untersuchungen eine hohe Reproduzierbarkeit sicherstellt: Ein kleiner Teil des Nierenbiopsiegewebes wird in voretikettierte Gefäße gegeben, die mit einem RNase-Inhibitor gefüllt sind. Hierin ist das Gewebe für die Genexpressionsanalyse für Wochen geschützt. Um der komplexen Architektur der Niere halbwegs gerecht zu werden, wurde in das Protokoll der ERCB eine standardisierte Mikrodissektion in Glomeruli und Tubulointerstitium eingeschlossen ([2]; **Abb. 1**).

Die folgende Übersicht zu Untersuchungen und Ergebnissen der ERCB ist gemäß oben genannter Aufgabenfelder des Konsortiums gegliedert: translationelle Forschung, Erkenntnisse zur Pathogenese humaner Nierenerkrankungen und Ausblicke zu diagnostischen Einsatzmöglichkeiten.

#### Translationelle Forschung

##### Von der Maus zum Menschen und wieder zurück

Bei der Vielzahl von Daten aus Tiermodellen wird es immer wichtiger, die Ergebnisse bezüglich ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen zu überprüfen. Häufig geschieht dies mittels morphologischer Methoden wie Histologie und Immunhistologie. Die ERCB bietet hier die Möglichkeit des Vergleichs auf einer weiteren Ebene. So wurde unlängst ein überraschender Befund von Ding et al. [4] aus einem Mausmodell am Menschen überprüft: Diese Arbeitsgruppe stellte fest, dass die Induktion von hypoxieassoziierten zellulären Prozessen in Podozyten ausreicht, um bei Mäusen eine rapid-progressive Glomerulonephritis (RPGN) auszulösen. Die Untersuchung mikrodissierter Glomeruli von Patienten mit einer RPGN erbrachte das gleiche Genexpressionsmuster wie

im Tiermodell. Obgleich der Pathomechanismus im Menschen unklar bleibt, können sich aus diesem Befund neue therapeutische Ansätze ergeben, denn die Blockierung eines spezifischen hypoxieinduzierten Genprodukts (CXCR4) durch Ding et al. verlängerte das Überleben der Mäuse.

Die Erkenntnis, dass die Hypoxie ein zentraler Mechanismus in der Pathogenese von Nierenerkrankungen ist, ergibt sich auch aus der Arbeit von Higgins et al. [10]. Diese zeigte, dass die renale Expression des hypoxieinduzierten Faktors HIF-1 $\alpha$  die Nierenfibrose bei Mäusen verstärkt. Es konnten mehrere Gene identifiziert werden, die hierbei von HIF-1 $\alpha$  reguliert werden. Mittels Daten der ERCB wurde gezeigt, dass dieser Pathomechanismus auch für den Menschen zu gelten scheint. Wieder sind therapeutische Optionen durch Interaktion mit hypoxieassoziierten Prozessen denkbar.

#### ➤ Denkbar sind Therapieoptionen durch Interaktion mit hypoxieassoziierten Prozessen

Während beide genannten Studien die humanen Daten zur Bestätigung tierexperimenteller Ergebnisse nutzten, ist auch der umgekehrte Weg sinnvoll: Aufgrund pathophysiologischer Überlegungen bildeten Sever et al. [16] die Hypothese, dass die Regulation von Cathepsin-L im Podozyten mit Veränderungen der glomerulären Filterfunktion einhergehen müssten. Erst nachdem Vorversuche in Zellkultur und Befunde am Menschen mittels der ERCB diese Hypothese stärkten, wurde in aufwändigen Tiermodellen gezeigt, dass Cathepsin-L bei Podozytenschäden tatsächlich eine Rolle spielt und bei Mäusen die Hemmung dieses Mechanismus therapeutisch eingesetzt werden kann.

#### Mechanismen der Nephropathien

##### Wann machen uns welche Gene krank – und wie?

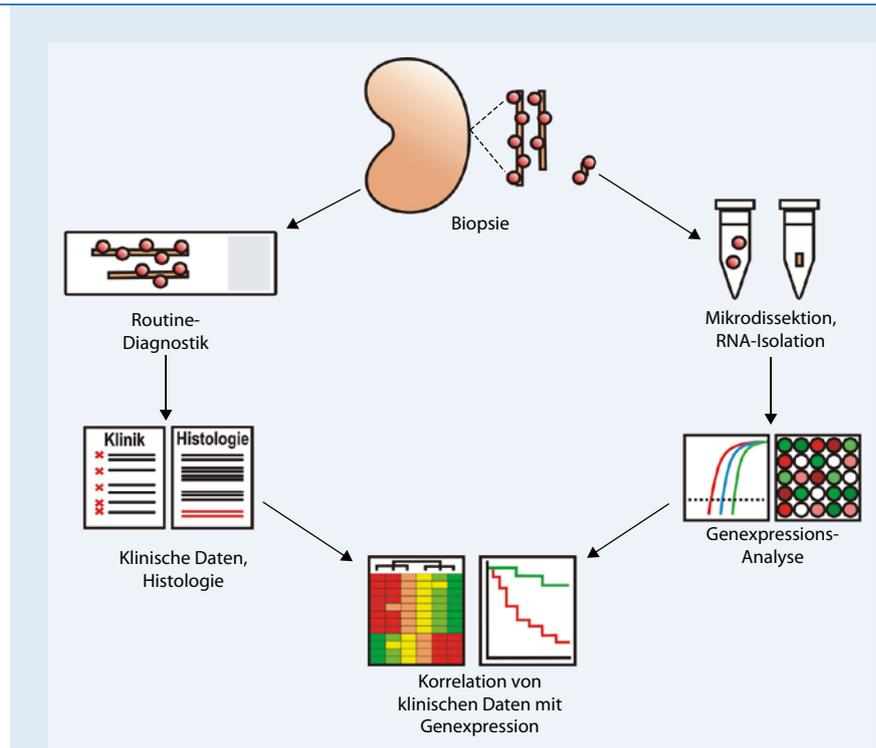
Die Möglichkeiten der ERCB nutzen zahlreiche Forschungsgruppen, um die Funktion bestimmter Gene und deren Regulationsmechanismen bei Nierenerkran-

kungen zu untersuchen. So wurde gezeigt, dass ein bestimmter Rezeptor für inflammatorische Botenstoffe (CX<sub>3</sub>CR1) bei der interstitiellen Fibrose eine Rolle spielt [11]. Andere wiesen zum ersten Mal eine verstärkte Expression bestimmter Kollagene (COL8A1/2) bei der diabetischen Nephropathie (DN) nach [7]. Und es fand sich der überraschende Befund, dass ein Wachstumsfaktor aus der Familie der „platelet derived growth factors“ bei der membranösen Glomerulopathie wohl von Podozyten gebildet wird [5].

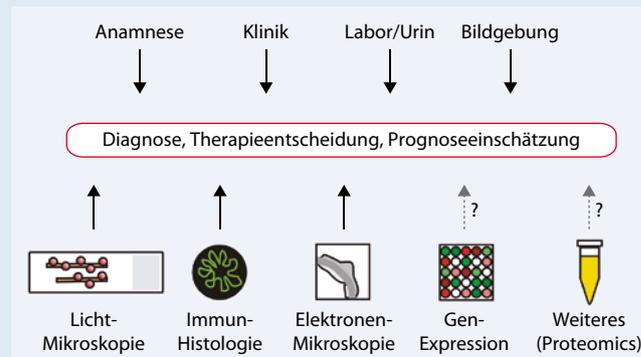
Diese Befunde zeigen beispielhaft, dass bei Nierenerkrankungen bestimmte Genprodukte neu oder verstärkt gebildet werden. Aber es ist nicht immer das Mehr eines Genprodukts, das der Niere schadet: Bei unterschiedlichen Mausmodellen für die DN wurde zwar eine Induktion des Wachstumsfaktors „vascular endothelial growth factor A“ (VEGF-A) beschrieben. Durch Hemmung von VEGF-A konnte im Tiermodell sogar der Verlauf der Erkrankung gemildert werden [3]. Untersuchungen an Biopsien der ER-CB erbrachten aber, dass – ganz anders als bei der Maus – VEGF-A in der Niere von Patienten mit DN vermindert gebildet wird. Und zudem ist die Gefäßdichte in der Niere bei dieser Nephropathie deutlich reduziert. Daher könnte eine Blockierung von VEGF-A, im Tiermodell vielversprechend und bei humanen Tumorerkrankungen eingesetzt, Patienten mit fortgeschrittener DN mehr schaden als nutzen [12, 1].

Die moderne Genexpressionsanalyse erlaubt das Erkennen komplexer, funktioneller Zusammenhänge. Dies sei an folgendem Beispiel dargestellt:

Es zeigte sich bei Biopsien von Patienten mit DN eine starke Expression von Molekülen, die sonst bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen. Von „Entzündungsgenen“ weiß man, dass ihre Regulation von bestimmten Transkriptionsfaktoren abhängig ist, die an Abschnitte der DNA binden, die für die Aktivierung dieser Gene verantwortlich sind (Promoterregionen). Tatsächlich ließ sich bei den Genen, die bei DN induziert waren, ein ganz spezifisches Muster von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in den Promoterregionen nachweisen [15]. Dieser Befund macht deutlich, dass die Entzündung



**Abb. 1** ▲ Schematische Darstellung der Europäischen Renalen cDNA Bank. Ein kleiner Teil des Nierenbiopsiematerials geht in die Genexpressionsstudie ein. Es wird eine Mikrodissektion von Glomeruli und Tubulointerstitium vorgenommen und RNA isoliert. Die Genexpressionswerte werden mittels Real-time-RT-PCR oder Microarrays erhoben



**Abb. 2** ▲ Denkbare Ergänzung der Routinediagnostik durch die Genexpressionsanalyse. Aktuell basieren Entscheidungen in der Nephrologie auf klinischen Parametern und Ergebnissen der Routine-Biopsiediagnostik. Eine zukünftige Ergänzung um die Genexpressionsanalyse und weitere moderne Ansätze (z. B. Proteomics) erscheinen vielversprechend

beim Fortschreiten der DN eine wichtige Rolle spielt. Im Tiermodell sind entzündungshemmende Therapieprinzipien für Folgeschäden dieser Stoffwechselerkrankung schon mit Erfolg geprüft worden [17]. Denkbar ist, dass eines Tages Patienten mit DN und einem ausgeprägten „Entzündungsprofil“ in der Nierenbiopsie von einer antiinflammatorischen Therapie profitieren könnten.

## Markermoleküle

### Führen mehr Informationen auch zu mehr Erkenntnis?

Nierenbiopsien sollen im klinischen Alltag natürlich eine Diagnose liefern, Therapieentscheidungen ermöglichen und Prognoseabschätzungen erleichtern. Kann in der Zukunft die Genexpressionsanalyse

für den klinischen Nephrologen von Nutzen sein?

Für eine der ersten Arbeiten mit dieser Fragestellung benutzten Henger et al. [9] zunächst Genexpressionsdaten aus Nephrektaten von hydronephrotischen Nieren. Es gelang anhand dieser Daten, spezifische Expressionsmuster für entzündliche bzw. fibrosierende Gewebeveränderungen zu identifizieren. Eine deutliche Induktion dieser „Markermoleküle“ konnte dann in Nierenbiopsien der ERCB nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression war mit dem Fortschreiten der Nierenerkrankung bis zur Dialysepflichtigkeit oder zum Tod assoziiert. Diese Studie stützt die Hypothese, dass sich klinische Verläufe mittels der renalen Genexpression schon zum Zeitpunkt der Biopsie vorhersagen lassen können.

Anhand publizierter Ergebnisse und Daten der ERCB wurden in der Zwischenzeit rund 350 Gene ausgewählt, die das Potenzial zu „Marker-Genen“ haben, das heißt zusätzliche Informationen zu Diagnose und Prognose liefern könnten. Erste unveröffentlichte Ergebnisse anhand von Untersuchungen an Nierenbiopsien von mehreren Dutzend Patienten zeigen, dass die Expressionsmuster tatsächlich mit der Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Biopsie zu korrelieren sind.

— **Entscheidend wird sein, ob mittels des Genexpressionsmusters zum Zeitpunkt der Biopsie auch die Nierenfunktion im Verlauf ausreichend zuverlässig vorausgesagt werden kann.**

Die Ergebnisse machen es denkbar, dass die Genexpressionsanalyse die etablierte Routinediagnostik ergänzen und um zusätzliche Informationen bereichern wird. Bis dahin werden die zu erwartenden „Markermoleküle“ aber noch viele klinische und statistische Prüfungen bestehen müssen. Und es sei nicht unerwähnt, dass auch die moderne Urindiagnostik mittels Proteomanalyse den Anspruch auf diagnostische Wertigkeit erhebt ([14, 6]; **Abb. 2**).

### Fazit für die Praxis

**Drei besondere Schwerpunkte der Genexpressionsanalyse an Nierenbiopsien**

**wurden in diesem Übersichtsartikel am Beispiel der Europäischen Renalen cDNA Bank – Kröner-Fresenius Biopsiebank vorgestellt: Genexpressionsanalysen ermöglichen es, auf effiziente Weise Ergebnisse aus Tiermodellen an humanen Nierenbiopsien zu überprüfen. Ebenso können mit neuen Analysemethoden Krankheitsmechanismen aus den Daten herausgelesen werden. Und schlussendlich weisen die Ergebnisse darauf hin, dass ausgewählte „Marker-Genen“ eine verbesserte Vorhersage des Krankheitsverlaufs erlauben können. Moderne Analysemethoden wie die Genexpressionsanalyse werden die etablierten Untersuchungsmethoden (Lichtmikroskopie, Immunhistologie, Elektronenmikroskopie) nicht ersetzen. Die derzeit vorliegenden Daten geben aber Anlass zur Hoffnung, dass die Genexpressionsanalyse als Ergänzung zur Routinediagnostik einen Zuwachs an Informationen bezüglich Diagnose, Therapieansprechen und Prognose des Patienten bieten wird.**

### Korrespondenzadresse

**PD Dr. C.D. Cohen**



Klinik für Nephrologie und Institut für Physiologie mit Zentrum für integrative Humanphysiologie, Universitätsspital und Universität Zürich  
Rämistr. 100, 8091 Zürich, Schweiz  
clemens.cohen@usz.ch

**Interessenkonflikt.** Keine Angaben

### Literatur

1. Baelde HJ, Eikmans M, Lappin DW et al. (2007) Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss. *Kidney Int* 71: 637–645
2. Cohen CD, Frach K, Schlondorff D, Kretzler M (2002) Quantitative gene expression analysis in renal biopsies: a novel protocol for a high-throughput multicenter application. *Kidney Int* 61: 133–140
3. Vriese AS de, Tilton RG, Elger M et al. (2001) Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* 12: 993–1000
4. Ding M, Cui S, Li C et al. (2006) Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat Med* 12: 1081–1087
5. Eitner F, Ostendorf T, Kretzler M et al. (2003) PDGFC expression in the developing and normal adult human kidney and in glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 14: 1145–1153

6. Fliser D, Novak J, Thongboonkerd V et al. (2007) Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J Am Soc Nephrol* 18: 1057–1071
7. Gerth J, Cohen CD, Hopfer U et al. (2007) Collagen type VIII expression in human diabetic nephropathy. *Eur J Clin Invest* 37: 767–773
8. Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6: 995–1001
9. Henger A, Kretzler M, Doran P et al. (2004) Gene expression fingerprints in human tubulointerstitial inflammation and fibrosis as prognostic markers of disease progression. *Kidney Int* 65: 904–917
10. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM et al. (2007) Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117: 3810–3820
11. Koziolok MJ, Schmid H, Cohen CD et al. (2007) Potential role of fractalkine receptor expression in human renal fibrogenesis. *Kidney Int* 72: 599–607
12. Lindenmeyer MT, Kretzler M, Boucherot A et al. (2007) Interstitial vascular rarefaction and reduced VEGF-A expression in human diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 18: 1765–1776
13. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC et al. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14: 1675–1680
14. Muller GA, Muller CA, Dihazi H (2007) Clinical proteomics – on the long way from bench to bedside? *Nephrol Dial Transplant* 22: 1297–1300
15. Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y et al. (2006) Modular activation of nuclear factor-kappaB transcriptional programs in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 55: 2993–3003
16. Sever S, Altintas MM, Nankoe SR et al. (2007) Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *J Clin Invest* 117: 2095–2104
17. Yozai K, Shikata K, Sasaki M et al. (2005) Methotrexate prevents renal injury in experimental diabetic rats via anti-inflammatory actions. *J Am Soc Nephrol* 16: 3326–3338