



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Neuropeptide receptor expression in inflammatory bowel disease

Beek, W.P. ter

### Citation

Beek, W. P. ter. (2008, April 3). *Neuropeptide receptor expression in inflammatory bowel disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12667>

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/1887/12667>

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

A large, light grey number '9' is centered on the page. The word 'Samenvatting' is written in bold black text across the top curve of the number.

**Samenvatting**

## Neuropeptiden

Neuropeptiden zijn signaaleiwitten die geproduceerd worden door zenuw, endocriene en/of immuuncellen. Door te binden aan G-eiwit gekoppelde receptoren kunnen zij hun werking uitoefenen. Ze kunnen werken als een neurocristine (in het zenuwstelsel), paracristine (in locale cellen) of hormonale (via het bloed elders in het lichaam) stof. De neuropeptiden zijn naast hun reguliere functies in het menselijk lichaam ook betrokken bij diverse ziektebeelden. Zo zijn bijvoorbeeld het aantal receptoren voor somatostatine, bombesine en substance P verhoogd in respectievelijk neuro-endocriene tumoren [1], prostaat kanker [2] en reumatoïde artritis [3]. Door het gebruik van radioactief gelabelde eiwitten kunnen deze receptoren en daarmee de ziekte zichtbaar gemaakt worden (in vivo scintigrafie) of ze kunnen gebruikt worden voor lokale radiotherapie.

Van deze en andere neuropeptiden en hun receptoren wordt gedacht dat ze ook een rol spelen in de pathologie van inflammatoir darmlijden (IBD), een chronische ontstekingsziekte van het maag-, darmkanaal. Het ziektebeeld van IBD wordt gekarakteriseerd door veranderingen in darmbewegingen (motiliteit), pijn en diarree. Alle drie de functies worden onder andere gereguleerd door neuropeptiden. Op basis van klinische, histologische en macroscopische kenmerken kan IBD in twee ziekten worden onderverdeeld, namelijk de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa.

In het **eerste hoofdstuk** van dit proefschrift is een overzicht gegeven van de rol die neuropeptiden in het algemeen en in IBD in het bijzonder, spelen bij het ontstekingsproces. De eiwitten kunnen worden uitgescheiden door de zenuwen van het enterische zenuwstelsel (het zenuwstelsel dat in de darm gelegen is) en door endocriene cellen in de mucosa van het maag- darmkanaal. Zowel de zenuwen als de endocriene cellen zijn dicht gelokaliseerd bij de ontstekingscellen die zich in de darmmucosa bevinden. Op het celoppervlak van deze ontstekingscellen bevinden zich receptoren voor neuropeptiden, hierdoor kunnen de ontstekingscellen door de neuropeptiden geactiveerd kunnen worden. Sommige van deze ontstekingscellen kunnen vervolgens zelf ook weer neuropeptiden uitscheiden. Daarnaast zijn neuropeptiden ook betrokken bij de regulatie van de motiliteit van het maag- darmkanaal en bij chloride secretie (van belang bij het

ontstaan van diarree). De betrokkenheid van de neuropeptiden bij deze drie processen die alle drie verstoord zijn in IBD patiënten, leidt tot de hypothese dat neuropeptiden een rol spelen in de pathologie van IBD. Een betere kennis over mogelijke wijzigingen in het aantal of type receptoren voor de neuropeptiden in patiënten met IBD zou kunnen leiden tot de ontwikkeling van nieuwe diagnostische of therapeutische mogelijkheden. Het is dus van belang dat de kennis over de expressie van deze receptoren bij patiënten met IBD toeneemt.

In het **tweede hoofdstuk** wordt een beschrijving gegeven van de verschillende onderzoeken die zijn uitgevoerd in het kader van dit proefschrift.

## Methoden

Voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift is een drietal verschillende technieken gebruikt om de expressie van neuropeptide receptoren te bestuderen. In de afgelopen jaren zijn moleculaire technieken (DNA en RNA niveau), waaronder reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) steeds belangrijker geworden in het receptor onderzoek. Een nadeel van deze techniek blijft echter dat de hoeveelheid mRNA in een cel niet noodzakelijkerwijs gecorreleerd is met het aantal receptoren dat tot expressie wordt gebracht. Een voorbeeld hiervan wordt gezien in hoofdstuk drie: terwijl autoradiografische bindingsstudies een toename van het aantal substance P receptoren in de mucosa van IBD patiënten liet zien, was er geen toename in de hoeveelheid mRNA in dat weefsel. Dit neemt echter niet weg dat moleculaire technieken hun eigen voordelen hebben, ze zijn erg gevoelig, snel en er kan gemakkelijk onderscheid gemaakt worden tussen de diverse types receptoren voor een neuropeptide. Echter voor informatie over de affiniteit, specificiteit en selectiviteit van een receptor zijn radioligand bindingsstudies (autoradiografie) noodzakelijk. Hierbij wordt radioactief gemerkt neuropeptide bij het weefsel gevoegd zodat het aan de mogelijk aanwezige receptoren voor dit neuropeptide kan binden. Eenmaal gebonden kan het radioactief gemerkte neuropeptide zichtbaar gemaakt worden en kan de hoeveelheid worden geteld. De derde toegepaste techniek is immunohistochemie, hiermee kan met behulp van specifieke antilichamen onder de microscoop

bekeken worden wat de exacte locatie (welk celtype) van de receptoren in het weefsel is. Door de drie hierboven beschreven technieken te combineren is het mogelijk om een totaalbeeld van de neuropeptide receptor status in het onderzochte weefsel te krijgen.

## Substance P

Substance P behoort tot de tachykinine familie, voor deze groep neuropeptiden zijn een drietal receptoren beschreven [4]. Substance P is onder andere aanwezig in het enterische zenuwstelsel en is daar een belangrijke mediator van de neurogene ontsteking, daarnaast heeft het ook nog een aantal andere ontstekingsbevorderende functies [5]. In **hoofdstuk drie** wordt de expressie van de substance P receptor (NK-1R) bij patiënten met IBD bestudeerd met behulp van de hierboven genoemde technieken. Andere onderzoeken hebben al wel eens de resultaten laten zien van één of twee van de beschreven technieken maar dit is voor het eerst dat de drie elkaar aanvullende technieken samen worden gebruikt in hetzelfde weefsel. Met de autoradiografie hebben wij laten zien dat de hoeveelheid substance P die aan de mucosa van IBD patiënten bindt hoger is dan de hoeveelheid in het controle weefsel (55 versus 18 fmol/g). De RT-PCR toonde echter aan dat de hoeveelheid NK-1R mRNA niet was toegenomen. Immunohistochemie liet zien dat de toegenomen binding van substance P in de mucosa het gevolg is van een toegenomen hoeveelheid binding op de bekende locaties en niet doordat de receptor ook op nieuwe plaatsen tot expressie wordt gebracht. Verder kan uit deze gegevens geconcludeerd worden dat de toename van de gemeten substance P receptoren afkomstig is van een interne voorraad van receptoren omdat de hoeveelheid mRNA, de bron voor nieuwe eiwitten, gelijk is gebleven in de ontstoken darm van IBD patiënten. Het verhoogde aantal substance P receptoren in IBD patiënten kan leiden tot een sterkere ontstekingsreactie zodra er substance P vrij komt. Dit leidt dan ook tot de hypothese dat NK-1 antagonisten een verlaging van de door substance P gemedieerde ontstekingsprocessen (geactiveerde immuuncellen, ion-secretie, verhoogde darmpermeabiliteit en motiliteit) tot gevolg heeft. Selectieve

antagonisten voor de NK-1 receptor worden nu al toegepast bij ziekten als reumatoïde artritis, depressie en angsten. Of deze antagonisten ook een positieve invloed zullen hebben bij IBD patiënten zal in gecontroleerde klinische studies bestudeerd moeten worden.

## Neurotensine

Een andere neuropeptide receptor die beschreven wordt in dit proefschrift is de neurotensine receptor. Neurotensine is een eiwit van 13 aminozuren dat in het gehele maag- darmkanaal voorkomt maar met name in het ileum [6]. Neurotensine is betrokken bij de regulatie van diverse processen in de darm waaronder chloride secretie [7], beweging [8] en ontsteking [9]. Neurotensine kan zijn effect uitoefenen door te binden aan drie verschillende receptoren, maar de neurotensine receptor-1 is de belangrijkste in het maag- darmkanaal [10]. In de onderzoeken, die beschreven worden in dit proefschrift, is het voorkomen van de neurotensine receptoren bestudeerd in de darm van IBD- en controle patiënten. In **hoofdstuk vier** worden de resultaten van de autoradiografie gegeven en in hoofdstuk vijf wordt een onderscheid gemaakt tussen de drie verschillende typen neurotensine receptoren met behulp van de technieken RT-PCR en immunohistochemie. De autoradiografie liet neurotensine binding zien in de spier van de dikke darm (colon) en in iets mindere mate ook in de spier van het laatste deel van de dunne darm (ileum). Tevens werd in de mucosa neurotensine binding gedetecteerd maar deze hoeveelheid was zeer klein. Tenslotte werd nog gevonden dat in de ontstoken spier van IBD patiënten minder neurotensine receptoren tot expressie komen dan in de niet ontstoken delen. In **hoofdstuk vijf** werd vervolgens met behulp van verdringingsproeven aangetoond dat de in hoofdstuk vier gedetecteerde binding het gevolg is van de aanwezigheid van de neurotensine receptor-1 en -3. Er is geen neurotensine receptor-2 gevonden. Met RT-PCR werd het mRNA van de neurotensine receptor-1 en -3 aangetoond in de humane darm. De hoeveelheid mRNA in de ontstoken darm van IBD patiënten was lager dan in de niet ontstoken darm, wat in overeenstemming is met de afgenomen neurotensine binding in de ontstoken darm van IBD patiënten zoals beschreven in hoofdstuk vier.

Immunohistochemie liet geen verandering zien in de lokalisatie van de neurotensine receptoren in het weefsel van IBD patiënten in vergelijking met de controles. De afname van het aantal bindingsplaatsen voor neurotensine in het ontstoken weefsel van IBD patiënten suggereert dat de receptor normaal een beschermend effect heeft op de darm. Dit wordt bevestigd door een muizenmodel waarin de toediening van een neurotensine receptor-1 antagonist leidde tot een verslechtering van de geïnitieerde ontsteking en waar de toediening van neurotensine juist een helend effect had [11].

## **Gastrine releasing peptide**

Het derde neuropeptide waarvan de receptor expressie bestudeerd werd maakt deel uit van de bombesine-familie. Deze familie oefent diverse functies uit in het maag- darmkanaal waaronder de stimulatie van endocriene en exocriene secretie, spiercontracties en in de regulatie van het immuunsysteem [12-14]. Gastrine-releasing peptide en neuromedin B zijn twee leden van deze familie die bij de mens voorkomen [15]. Er zijn drie receptoren voor deze groep van neuropeptiden beschreven [16-18] en in **hoofdstuk zes** laten we zien dat in de humane darm alleen de gastrine-releasing peptide receptor tot expressie komt. Deze receptor komt met name voor in de longitudinale spier en myenterische plexus van het colon en in mindere mate ook in de circulaire spier van colon en ileum. In de mucosa werd alleen in het colon een zeer lage hoeveelheid gastrine-releasing peptide receptor aangetroffen en niet in het ileum. Bij IBD patiënten werd een verschil gezien tussen patiënten met de ziekte van Crohn, bij wie het aantal receptoren in de spier van het colon is afgenomen, en patiënten met colitis ulcerosa, waar dit ongewijzigd was. Door dit verschil zou de gastrine-releasing peptide receptor eventueel gebruikt kunnen worden om beide ziektebeelden van elkaar te onderscheiden. De afname van gastrine-releasing peptide receptoren die gezien wordt in patiënten met de ziekte van Crohn kan een beschermingsmechanisme zijn van deze groep tegen de verstoorde motiliteit gezien in IBD.

## Motiline

In **hoofdstuk zeven** is het onderzoek naar de expressie van de motiline receptoren beschreven. Motiline is een maag- darm eiwit dat met name bekend is door zijn rol in fase III van het migrerende motor complex [19]. Maar motiline heeft ook een rol in de motiliteit van de rest van het maag- darmkanaal [20-22]. Met behulp van autoradiografie hebben we in dit proefschrift aangetoond dat er motiline bindingsplaatsen aanwezig zijn in de spier van het colon en ileum, alhoewel de hoeveelheid lager is dan in het eerste deel van het maag- darmkanaal. Naast de binding in de spier hebben we ook laten zien dat de receptor voorkomt in de mucosa. De exacte functie van motiline receptoren in de mucosa is nog niet bekend, maar daar ze met drie verschillende technieken zijn aangetoond staat hun aanwezigheid niet meer ter discussie. Bij patiënten met IBD is de mucosale motiline receptor expressie onveranderd. In de spier van het colon werd een geringe toename gezien van de motiline binding bij patiënten met colitis ulcerosa maar niet bij patiënten met de ziekte van Crohn. Maar echt grote veranderingen in de motiline receptor expressie in IBD patiënten in vergelijking met controles werden er niet gezien, hetgeen suggereert dat motiline waarschijnlijk geen heel belangrijke rol speelt in het ontstekingsproces van IBD.

## Interacties

Samengevat, dit proefschrift beschrijft de expressie van de receptoren van de neuropeptiden substance P, neurotensine, gastrine-releasing peptide en motiline in weefsel van controle en IBD patiënten. In de mucosa van controle colon worden de receptoren van alle vier de neuropeptiden tot expressie gebracht, met de receptoren van substance P en motiline in de hoogste concentraties. In de mucosa van het ileum wordt de gastrine-releasing peptide receptor niet tot expressie gebracht, de neurotensine receptor is wel detecteerbaar maar de hoeveelheid is minder dan in het colon. Dit is in tegenstelling tot de receptoren van substance P en motiline want die worden juist in de mucosa van het ileum meer tot expressie gebracht dan in het colon. In de spier komen ook de receptoren van alle vier de

neuropeptiden voor, maar de hoeveelheid motiline receptoren is laag (ileum iets hoger dan het colon). Van de receptoren voor de andere drie neuropeptiden is de binding in het ileum lager dan de binding die in het colon gezien wordt.

Uit de literatuur is bekend dat er vaak interacties optreden tussen diverse eiwitten. De secretie van het ene neuropeptide kan gestimuleerd worden door een ander neuropeptide, cytokine of hormoon. Bijvoorbeeld, in honden worden darmcontracties gezien na stimulatie met bombesine, het werkinginsmechanisme van bombesine blijkt echter via substance P te lopen [23]. Andere studies hebben laten zien dat bombesine ook in staat is om de secretie van neurotensine en motiline te verhogen [24,25]. In onze studie was de neurotensine binding in het ileum gecorreleerd met de hoeveelheid bombesine binding in de longitudinale en circulaire spier ( $r = 0.77$  en  $r = 0.68$ ), dit ondersteunt de in de literatuur beschreven connectie tussen bombesine en neurotensine. Verder vonden wij ook dat in het colon er een negatief verband is tussen de binding van substance P in de mucosa en neurotensine in de spier ( $r = -0.53$ ). Oftewel de toename van substance P receptoren in de mucosa van de IBD patiënt gaat gepaard met een afname van de neurotensine receptoren in de spier van diezelfde patiënt. Het is bekend dat de ontstekingsbevorderende cytokines IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18 en TNF $\alpha$  het aantal NK-1 receptoren kunnen laten toenemen via een mechanisme waarbij ook de transcriptie factor NF-k $\beta$  betrokken is [26,27]. Daarnaast stimuleert de interactie van substance P met zijn receptor de expressie van COX-2. In een ontstekingsmodel in muizen heeft men laten zien dat de verhoging van COX-2 gezien bij ontstekingen te niet kon worden gedaan door de toediening van een specifieke NK-1 receptor antagonist [28]. Ook de expressie van neurotensine receptoren is gekoppeld met de expressie van de signaaleiwitten NF-k $\beta$  en COX-2 [11,29]. Deze gezamenlijke regulatie mechanismen kunnen een verklaring zijn voor de correlatie tussen de expressie van beide receptoren. Maar de grote diversiteit aan plaatsen waar beide receptoren in de mens voorkomen alsmede het grote aantal cellen waarop zij invloed kunnen uitoefenen maakt het ingewikkeld om een dergelijke interactie te beschrijven. Er is dan ook meer kennis van dergelijke mechanismen nodig voordat nieuwe therapieën onderzocht kunnen worden.

## Conclusies

Bij patiënten met IBD is er sprake van een toegenomen substance P receptor expressie in de mucosa en een afname in neurotensine en gastrine-releasing peptide (alleen bij Crohn patiënten) receptoren in de spier. De klinische relevantie van deze toename in substance P receptoren en afname in neurotensine en gastrine-releasing peptide receptoren is niet bestudeerd in dit proefschrift. Aanvullende studies zullen uitgevoerd moeten worden om te bekijken of deze veranderingen het gevolg zijn van het ontstekingsproces in de darm van IBD patiënten of dat de veranderde expressie juist het ontstekingsproces in de darm verergert. Echter dit proefschrift beoogt een betere kennis van neuropeptide receptor expressie in darmweefsel van IBD- en controle patiënten. Deze kennis kan gebruikt worden bij het zoeken naar mogelijkheden voor het gebruik van deze neuropeptiden in nieuwe diagnostische testen en in de therapie van patiënten met IBD.

## References

1. Reubi JC. Neuropeptide receptors in health and disease: the molecular basis for in vivo imaging. *J Nucl Med* 1995;36:1825-1835.
2. Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res* 1999;59:1152-1159.
3. Walsh DA, Mapp PI, Wharton J, et al. Localisation and characterisation of substance P binding to human synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1992;51:313-317.
4. Hokfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *Journal of Internal Medicine* 2001;249:27-40.
5. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol Ther* 1997;73:219-263.
6. Hammer RA, Leeman SE, Carraway R, et al. Isolation of human intestinal neurotensin. *Journal of Biological Chemistry* 1980;255:2476-2480.

7. Riegler M, Castagliuolo I, Wang C, et al. Neurotensin stimulates Cl(-) secretion in human colonic mucosa In vitro: role of adenosine. *Gastroenterology* 2000;119:348-357.
8. Labbé-Jullié C, Deschaintres S, Gully D, et al. Effect of the nonpeptide neurotensin antagonist, SR 48692, and two enantiomeric analogs, SR 48527 and SR 49711, on neurotensin binding and contractile responses in guinea pig ileum and colon. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:267-276.
9. Castagliuolo I, Wang CC, Valenick L, et al. Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. *J Clin Invest* 1999;1999 Mar;103:843-849.
10. Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:302-309.
11. Brun P, Mastrotto C, Beggiao E, et al. Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G621-G629.
12. Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol* 2005;49:293-300.
13. De la Fuente M, Del Rio M, Ferrandez MD, et al. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology* 1991;73:205-211.
14. van Tol EA, Elzo Kraemer CV, Verspaget HW, et al. Intravenous administration of bombesin in man stimulates natural killer cell activity against tumour cells. *Neuropeptides* 1991;18:15-21.
15. Spindel ER. Mammalian bombesin-like peptides. *Trends in Neuroscience* 1986;9:130-133.
16. Battey JF, Way JM, Corjay MH, et al. Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:395-399.
17. Gorbulev V, Akhundova A, Buchner H, et al. Molecular cloning of a new bombesin receptor subtype expressed in uterus during pregnancy. *Eur J Biochem* 1992;208:405-410.

18. Wada E, Way J, Shapira H, et al. cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron* 1991;6:421-430.
19. Vantrappen G, Janssens J, Peeters TL, et al. Motilin and the interdigestive migrating motor complex in man. *Dig Dis Sci* 1979;24:497-500.
20. Adachi H, Toda N, Hayashi S, et al. Mechanism of the excitatory action of motilin on isolated rabbit intestine. *Gastroenterology* 1981;80:783-788.
21. Harada N, Chijiwa Y, Misawa T, et al. Direct contractile effect of motilin on isolated smooth muscle cells of guinea pig small intestine. *Life Sci* 1992;51:1381-1387.
22. van Assche G, Depoortere I, Thijs T, et al. Contractile effects and intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling induced by motilin and erythromycin in the circular smooth muscle of human colon. *Neurogastroenterology and Motility* 2001;13:27-35.
23. Angel F, Go VL, Szurszewski JH. Innervation of the muscularis mucosae of canine proximal colon. *J Physiol* 1984;357:93-108.
24. Dumoulin V, Dakka T, Plaisancie P, et al. Regulation of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide, peptide YY, and neurotensin secretion by neurotransmitters and gut hormones in the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology* 1995;136:5182-5188.
25. Poitras P, Trudel L, Miller P, et al. Regulation of motilin release: studies with ex vivo perfused canine jejunum. *Am J Physiol* 1997;272:G4-G9.
26. Simeonidis S, Castagliuolo I, Pan A, et al. Regulation of the NK-1 receptor gene expression in human macrophage cells via an NF-kappa B site on its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2957-2962.
27. Weinstock JV, Blum A, Metwali A, et al. IL-18 and IL-12 signal through the NF-kappa B pathway to induce NK-1R expression on T cells. *J Immunol* 2003;170:5003-5007.
28. Koon HW, Zhao D, Zhan Y, et al. Substance P stimulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 expression through JAK-STAT activation in human colonic epithelial cells. *J Immunol* 2006;176:5050-5059.

29. Yeh KY, Yeh M, Glass J, et al. Rapid activation of NF-kappaB and AP-1 and target gene expression in postischemic rat intestine. *Gastroenterology* 2000;118:525-534.