

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/25869> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Wout, Emily F.A. van 't

Title: Endoplasmic reticulum stress in the lung : lessons from α 1-antitrypsin deficiency

Issue Date: 2014-06-04

Addendum

Nederlandse samenvatting

Publications

Curriculum Vitae

Dankwoord (acknowledgements)

Nederlandse samenvatting

Chronic obstructive pulmonary disease (chronisch obstructieve longziekte; afgekort COPD), een verzamelnaam voor longemfyseem en chronische bronchitis, is een irreversibele chronische longziekte die voornamelijk wordt veroorzaakt door roken en mogelijk ook door luchtvervuiling. Door het roken worden de longblaasjes definitief afgebroken (longemfyseem) en raken de luchtwegen ontstoken waarbij vaak slijm wordt gevormd (chronische bronchitis). Behalve roken kunnen ook erfelijke afwijkingen lijden tot de ontwikkeling van longemfyseem. De bekendste en meest belangrijke genetische risicofactor is een tekort aan α_1 -antitrypsine (α_1 -antitrypsine deficiëntie), waarbij mensen door een mutatie een erfelijk tekort hebben aan het eiwit α_1 -antitrypsine. In de gezonde long is α_1 -antitrypsine een remmer van eiwit-afbrekende enzymen die vrijkomen bij ontsteking (proteasen), en draagt op die manier bij aan het beschermen van de long tegen weefselschade die kan ontstaan tijdens een ontstekingsproces. Alfa₁-antitrypsine wordt vooral in de lever aangemaakt en bereikt de long via de bloedbaan, maar wordt ook lokaal in de long door macrofagen en epitheelcellen geproduceerd. De concentratie α_1 -antitrypsine in de long echter wordt in hoge mate bepaald door productie in de lever. Bij pasgeborenen kan een mutatie in α_1 -antitrypsine leiden tot ernstige leverontstekingen (hepatitis) en geelzucht, en bij volwassenen, en met name rokers, tot een zeer sterk verhoogde kans op de ontwikkeling van longemfyseem vanaf het 35^e levensjaar.

De productie van eiwitten in een cel begint in de nucleus (kern) met het aflezen van DNA: de transcriptie. Het ontstane messenger-RNA (mRNA) verplaatst naar het cytoplasma, waar het door de ribosomen vertaald wordt naar een aminozuurketting (polypeptide): de translatie. Dit polypeptide wordt in het endoplasmatisch reticulum (ER) gevouwen in zijn tertiaire structuur: de posttranslationele modificatie. Alleen correct gevouwen eiwitten zijn biologisch actief en worden uitgescheiden door het ER. Dus naast het vouwen van eiwitten, vervult het ER ook een functie in de kwaliteitscontrole van gevormde eiwitten. Het vouwen van eiwitten kan door verschillende zaken verstoord worden, met als gevolg een ophoping van verkeerd gevouwen eiwitten in het ER, wat ER stress oplevert. De complexe fysiologische cellulaire reactie van het ER heeft als doel

de homeostase in een cel te herstellen door enerzijds het aanbod van nieuw te vouwen eiwitten te reduceren (translationele repressie) en anderzijds de capaciteit van het vouwen te verhogen. Bij langdurige ER stress geeft deze respons aanleiding tot een verhoogde ontstekingsreactie en geprogrammeerde celdood. Naast ER stress kunnen drie andere oorzaken een translationele repressie geven, te weten ijzergebrek, virus infecties en aminozuurtekorten; dit wordt gezamenlijk de Integrated Stress Response (ISR) genoemd.

Veruit de meest voorkomende mutatie die leidt tot α_1 -antitrypsine deficiëntie is de zogenaamde Z mutatie. Bij deze mutatie wordt het Z α_1 -antitrypsine nog wel gemaakt in de lever, maar kan het eiwit zich niet goed vouwen in het ER. Dit leidt niet alleen tot ophoping van het Z α_1 -antitrypsine in het ER, maar ook tot samenklontering van de opgehoopte eiwitten (polymeren) en een beperkte uitscheiding in de bloedbaan. Door het ontstane tekort aan α_1 -antitrypsine wordt de long lokaal onvoldoende beschermd tegen de proteasen die vrijkomen bij de door o.a. roken ontstane ontsteking; daarnaast dragen de polymeren van Z α_1 -antitrypsine lokaal in de long ook zelf bij aan de ontsteking doordat ze ontstekingscellen aantrekken (chemotaxie).

Het proces van polymeervorming en de vraag of deze polymeren ook ER stress veroorzaken is uitgebreid onderzocht in levercellen. Interessant hierbij is dat er in deze cellen geen ER stress optreedt, ondanks de ophoping van fout-gevouwen Z α_1 -antitrypsine in het ER. Echter, de cellen die polymeren bevatten zijn wel extra gevoelig voor ER stress veroorzaakt door processen van buitenaf, met als gevolg dat deze cellen meer ontstekingsmediatoren uitscheiden en sneller dood gaan. In de afgelopen jaren rees de vraag of dit proces zich niet alleen in levercellen maar ook lokaal in de macrofagen en epitheelcellen van de long afspeelt, waardoor deze cellen ook zelf zouden kunnen bijdragen aan het ontstekingsproces in de long. Die vraag staat in dit proefschrift centraal. Daarnaast worden in dit proefschrift andere (extracellulaire) oorzaken van de ER stress respons bestudeerd.

In **hoofdstuk 1** wordt een algemene inleiding over COPD en α_1 -antitrypsine deficiëntie, de ER stress respons en cellulaire signaalverwerking bij ontstekingsprocessen gegeven. De ER stress respons is een complexe respons, die overlap heeft met andere stress responsen, zoals de eerder genoemde Integrated Stress Response (ISR). In de laatste jaren is steeds meer bekend geworden over de rol van de ISR in het ontstaan en het beloop van verschillende soorten longziekten, waaronder α_1 -antitrypsine deficiëntie. In **hoofdstuk 2** wordt deze kennis in detail besproken.

In **hoofdstuk 3** wordt een nieuwe techniek beschreven voor het nauwkeurig en kwantitatief meten van een centrale pijler in de ER stress respons, namelijk de splitsing van het mRNA dat de informatie bevat voor het X-box binding protein-1 (XBP-1). Deze techniek wordt vervolgens ook gebruikt in het onderzoek dat staat beschreven in **hoofdstuk 4, 5 en 7**.

Behalve intrinsieke factoren, zoals gen mutaties, kunnen ook extrinsieke factoren leiden tot de ophoping van eiwitten in het ER. Het is bijvoorbeeld bekend dat virussen voor een overmatige eiwitproductie in een cel zorgen, zodat niet alle eiwitten verwerkt kunnen worden en deze ophopen in het ER en ER stress geven. Tot voor kort was niet bekend of bacteriën eenzelfde fenomeen konden veroorzaken. In **hoofdstuk 4** staat onderzoek centraal naar de ER stress respons en de ISR in luchtwegepitheelcellen die werden blootgesteld aan virulentie factoren van de bacterie *Pseudomonas aeruginosa*. Hieruit bleek dat de inductie van de ISR, en dan met name productie van GADD34 via de ijzer gereguleerde receptor HRI, cruciaal was voor de overleving van in het laboratorium gekweekte luchtwegepitheelcellen.

De gevolgen van Z α_1 -antitrypsine en de polymeren in levercellen is uitgebreid bestudeerd en het is al langere tijd bekend dat deze polymeren ook aanwezig zijn in de longen, en in één patiënt zelfs tien jaar na een levertransplantatie. Lokale productie van deze polymeren en de cellulaire consequenties voor deze cellen zouden in grote mate kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van longemfyseem, en mogelijk ook in het onderhouden van de ziekte. In **hoofdstuk 5 en 7** werden longepitheelcellen en macrofagen, de twee grootste bronnen van lokale α_1 -antitrypsine productie in de long, onderzocht

op het produceren van polymeren. In **hoofdstuk 5** werd de “kritieke $Z \alpha_1$ -antitrypsine concentratie” (de drempel) vastgesteld waarbij cellen overgaan tot het produceren van de polymeren. Uit deze drempelconcentratie bleek dat zowel luchtwegepitheelcellen (**hoofdstuk 5**) als macrofagen (**hoofdstuk 7**) niet voldoende $Z \alpha_1$ -antitrypsine produceren om polymeervorming mogelijk te maken. Uit beide hoofdstukken bleek ook dat bij de afwezigheid van deze polymeren geen overgevoeligheid bestaat voor ER stress. Aan de andere kant produceren de longepitheelcellen van $Z \alpha_1$ -antitrypsine deficiënte patiënten wel overmatig veel ontstekingsmediatoren (**hoofdstuk 5**), en dragen daarmee dus bij aan de verhoogde ontstekingsreactie in de long (hyperinflammatie). Macrofagen vertonen deze “hyperinflammatoire” respons niet (**hoofdstuk 7**), waarschijnlijk omdat deze cellen de EGF receptor (de receptor verantwoordelijk voor de ontstekingsreactie in de epitheelcellen) nauwelijks tot expressie brengen. Daarnaast werden in **hoofdstuk 6** en **7** verschillen in α_1 -antitrypsine productie door verschillende soorten macrofagen onderzocht. Daarin werd gevonden dat bij zowel gezonde mensen als bij α_1 -antitrypsine deficiënte patiënten de ontstekingsbevorderende macrofagen veel meer α_1 -antitrypsine maken dan de ontstekingsremmende macrofagen.

Deze resultaten geven ons meer inzicht in het ziekteproces bij patiënten met type ZZ α_1 -antitrypsine deficiëntie met longemfyseem. Naar aanleiding van de uitkomsten van **hoofdstuk 5** zou bijvoorbeeld een therapie met EGF receptor blokkers of geïnhaled α_1 -antitrypsine tot de mogelijkheden behoren om zo de ontstekingsreactie lokaal in de long te onderdrukken. Hier moet echter meer onderzoek voor gedaan worden om daarover duidelijkheid te krijgen.

Publications

van 't Wout EFA, Hiemstra PS, Marciniak SJ (2014) The integrated stress response in lung diseases, *Am J Respir Cell Mol Biol.*, in press

van 't Wout EFA, Dickens JA, van Schadewijk A, Haq I, Kwok HF, Ordóñez A, Murphy G, Stolk J, Lomas DA, Hiemstra PS, Marciniak SJ (2014) Increased ERK signalling promotes inflammatory signalling in primary airway epithelium expressing Z α_1 -antitrypsin, *Hum Mol Gen.* 23:929-41

Thomas SE, Malzer E, Ordóñez A, Dalton LE, van 't Wout EFA, Liniker E, Crowther DC, Lomas DA, Marciniak SJ (2013) p53 and translation attenuation regulate distinct cell cycle checkpoints during endoplasmic reticulum (ER) stress, *J Biol Chem.* 288:7606-17

van 't Wout EFA, van Schadewijk A, Savage ND, Stolk J, Hiemstra PS (2012) Production of α_1 -antitrypsin by pro- and anti-inflammatory macrophages and dendritic cells, *Am J Respir Cell Mol Biol.* 46(5):607-13.

van Schadewijk A, van 't Wout EFA, Stolk J, Hiemstra PS (2012) A quantitative method for detection of spliced X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA as a measure of endoplasmic reticulum (ER) stress, *Cell Stress Chaperones.* 17(2):275-9

van 't Wout EFA, van Schadewijk A, van Boxtel R, Dalton LE, Clarke HJ, Tommassen J, Marciniak SJ, Hiemstra PS (2014) Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* induce both the unfolded protein and integrated stress responses, submitted

van 't Wout EFA, van Schadewijk A, Lomas DA, Stolk J, Marciniak SJ, Hiemstra PS (2014) Monocytes and monocyte-derived macrophages function in α_1 -antitrypsin deficiency, submitted

Ninaber MK, Hamersma WBGJ, Schouffoer AA, van 't Wout EFA, Stolk J (2014) The global peripheral chemoreflex drive in patients with systemic sclerosis: a rebreathing and exercise study, submitted

Curriculum Vitae

Emily Fiona Ariëlle van 't Wout was born on 20 April 1987 in Moerkapelle, the Netherlands. After graduating cum laude for her pre-university education at the Erasmus College, Zoetermeer, the Netherlands, she started studying Medicine in 2005 at the University of Leiden, the Netherlands. In addition to her study, she conducted a research project on the chemoreflex responsiveness in sclerodermia at the Department of Pulmonology under supervision of Dr. Jan Stolk and Maarten K. Ninaber. In March 2009, she started her scientific project as a medical student on nicotine-acetylcholine receptors in COPD and α_1 -antitrypsin deficiency at the Department of Pulmonology with Prof. dr. Pieter S. Hiemstra and Dr. Jan Stolk. After the completion of her doctorate in September 2009, she started her PhD project in the same department, of which the results are described in this thesis. As part of her PhD, she conducted a three months traineeship in the laboratory of Prof. dr. David A. Lomas and Dr. Stefan J. Marciniak at the Cambridge Institute for Medical Research (University of Cambridge, United Kingdom). She subsequently received the European Alpha₁-antitrypsin Laurell's Training Award which allowed her to finish the last year of her PhD at the University of Cambridge, United Kingdom. In January 2014 she started her clinical rotations to obtain her MD degree.

Dankwoord (Acknowledgements)

Het schrijven van dit proefschrift heb ik niet alleen gedaan. Via deze weg wil ik graag iedereen bedanken die op welke wijze dan ook heeft bijgedragen aan de totstandkoming van dit proefschrift. Maar in het bijzonder wil ik de volgende mensen graag bedanken.

Naast mijn voltallige promotiecommissie, wil ik ook graag de leden van mijn oppositiecommissie hartelijk bedanken: prof. dr. C. Taube (Universiteit Leiden, Leiden), prof. dr. C. van Kooten (Universiteit Leiden, Leiden), prof. dr. P.J. Sterk (Academisch Medisch Centrum, Amsterdam) en dr. I. Heijink (Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen).

Lab Longziekten, bedankt voor de gezellige tijd. Marianne en Renate, ik zal nooit zo goed worden als jullie in het kweken van cellen, maar ik heb genoten van jullie privélessen in mijn beginperiode! Annemarie, heel erg bedankt voor het begeleiden van mijn eerste babystapjes in de wondere wereld van het lab. Ik vond het fijn dat ik jouw eerste student mocht zijn (en ook gelijk de laatste, al weet ik nou niet of dat een heel goed teken is) en al je ondersteuning tijdens mijn werk als promovenda en daarna.

Beste Pieter en Jan, bedankt voor alle begeleiding en discussies.

Dear members of the Lomas' and Marciniak's lab, you made my time in Cambridge unforgettable. Dear Jenny, thanks for being my head; it was a great honour to be the back part of JEmily. Dear Lucy, you are the most hilarious person I ever met (and I mean it in a good way). You will be an awesome doctor! Dear Hanna, Elke and Adriana, you all work so hard, take some time off some day, the world is beautiful!

Dear David, it was a great honour to work under your wings. Thanks for having me!

Dear Stefan, thanks for rewriting my thesis (I like your OCD), adopting me and all your faith in me. It will be my pleasure to come back to work for you.

Lieve Annefieke, Barbara, Michelle, Susan en Yordi, super bedankt voor al jullie gezelligheid en vertrouwen naast mijn wereld in het onderzoek.

Lieve Katrientje, mijn paranimf; het was heel fijn om mijn eerste jaren als promovenda met jou door te brengen, wat heb ik met jou gelachen. Super bedankt dat ik alle leuke en minder leuke momenten met jou mocht en nog steeds mag delen.

Lieve Caia, I owe you big time cool beans. You just made me realise the important things in life.

Lieve zus en Arie, Leroy en Cyan, het is helaas geen voorleesboek geworden, maar hopelijk vinden jullie de plaatjes mooi genoeg. Het is fijn om jullie zusje en tante te zijn!

Lieve paps en mams. Duizend maal dank voor jullie oneindige steun, liefde en vrijheid die jullie mij altijd hebben gegeven.

Lieve lieff, lieve Ward. Ik vind het moeilijk onder woorden te brengen hoezeer ik jou als persoon waardeer. Ik ben intens gelukkig met jou als "other half". Jij weet altijd het beste in mij naar boven te halen. Oneindig veel dank dat jij altijd mij mezelf laat zijn en bedankt voor alles wat ik van jou heb mogen leren. Ik hou van jou!

