



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Molecular mechanisms of epithelial host defense in the airways

Vos, J.B.

Citation

Vos, J. B. (2007, January 11). *Molecular mechanisms of epithelial host defense in the airways*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/9749>

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/1887/9749>

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

CHAPTER 8

NEDERLANDSE SAMENVATTING

ACHTERGROND

Ontstekingsaandoeningen van de luchtwegen zoals astma en COPD kunnen het dagelijkse leven van een patiënt ernstig belemmeren. Het is tot op heden onvoldoende bekend waarom deze aandoeningen gepaard gaan met ontstekingen. Wel is bekend dat het luchtwegepitheel bijdraagt aan de pathofysiologie van deze aandoeningen. Inzicht in de biologische mechanismen die in het luchtwegepitheel een rol spelen bij het voorkomen van luchtwegaandoeningen zoals astma en COPD kunnen bijdragen tot de ontwikkeling van betere therapieën en daarmee een gunstiger toekomstperspectief voor deze patiënten.

Dit proefschrift beschrijft de resultaten van onderzoek naar moleculaire mechanismen van de eerstelijnsafweer in de luchtwegen. Met name luchtwegepitheelcellen spelen hierin een belangrijke rol. Deze cellen vormen de bekleding van de luchtwegen die de barrière vormt tussen het lichaam en het externe milieu. De centrale onderzoeksvraag was: "Welke mechanismen worden door luchtwegepitheelcellen benut om de gastheer te beschermen tegen luchtweginfecties?". Het doel van de studies beschreven in dit proefschrift was om enerzijds de vroege eerstelijnsafweerreactie van luchtwegepitheelcellen in kaart te brengen. Anderzijds was het doel de expressie van potentiële (nieuwe) epitheliale moleculen die betrokken zijn bij de afweer te identificeren en karakteriseren. De resultaten beschreven in dit proefschrift hebben genen en moleculaire netwerken opgehelderd die niet eerder in verband zijn gebracht met ontstekingsaandoeningen in de luchtwegen. Een opmerkelijke uitkomst van het onderzoek is dat de afweerstrategieën van het luchtwegepitheel grote gelijkenissen vertonen met die van huidepitheel.

DE LONGEN

De primaire functie van de longen is het bewerkstelligen van de gasuitwisseling tussen het lichaam en de omgeving. Het oppervlak van de luchtwegen dat actief bijdraagt aan de gaswisseling bedraagt $\sim 100\text{m}^2$. Dagelijks wordt ~ 10.000 liter omgevingslucht ingeademd om het lichaam te voorzien van zuurstof (O_2) en te ontdoen van koolstofdioxide (CO_2). Deze omgevingslucht kan potentiële ziekteverwekkers bevatten zoals bacteriën, gisten, schimmels, virussen en kleine parasieten. Bij gezonde mensen komen ernstige luchtweginfecties slechts zelden voor, ondanks de warme en vochtige omstandigheden in de luchtwegen die een uitstekende vestigingsplaats kunnen zijn voor ziekteverwekkers. Het afweersysteem biedt effectieve bescherming tegen ingeademde ziekteverwekkers. Omdat luchtweginfecties bij gezonde personen slechts zelden voorkomen is het van belang te achterhalen wat de oorzaken kunnen zijn van herhaalde luchtweginfecties bij patiënten met aandoeningen aan de luchtwegen. Er zijn sterke

aanwijzingen dat voornamelijk defecten in de eerstelijnsafweer verantwoordelijk zijn voor deze terugkerende luchtweginfecties.

HET AFWEERSYSTEEM

Het menselijke afweersysteem biedt het lichaam bescherming tegen schadelijke microorganismen. Het is opgebouwd uit het (i) aangeboren en het (ii) adaptieve afweersysteem. Hoewel aangeboren en adaptieve afweer vaak afzonderlijk worden beschreven werken deze twee afweertypen met elkaar samen om ziekteverwekkers te lijf te gaan. Karakteristiek voor het adaptieve afweersysteem is de specifieke afweerreactie tegen indringers. Deze afweerreactie omvat onder meer de activatie van witte bloedcellen en B-cellen. De activatie leidt uiteindelijk tot productie van antistoffen en specifieke eliminatie van de indringer. De benodigde tijd om de adaptieve afweerreactie op gang te brengen bedraagt enkele dagen. Hoewel adaptieve afweer zeer specifiek functioneert en daarnaast ook bescherming biedt tegen toekomstige infecties van dezelfde ziekteverwekker is deze vorm van immuniteit niet erg effectief als eerste, preventieve afweer.

Het aangeboren afweersysteem biedt bescherming tegen infecties door de vorming van een actief en dynamisch "schild" tegen ziekteverwekkers. Het reageert redelijk aspecifiek, maar uiterst snel op een breed scala van biochemische structuren, die aanwezig zijn op ziekteverwekkers. Het zorgt er in vrijwel alle gevallen voor dat ingeademde ziekteverwekkers geëlimineerd worden voordat deze een infectie kunnen veroorzaken.

HET LUCHTWEGEPITHEEL

De eerstelijnsafweer in de luchtwegen wordt gevormd door een fysieke en chemische barrière. Het epitheelweefsel dat de binnenzijde van de luchtwegen bekleedt, vormt de eigenlijke fysieke barrière tussen de buitenlucht en het lichaam. Het luchtwegepitheel vervult een uitermate belangrijke rol bij de eerstelijnsafweer in de luchtwegen. Het wordt zeer frequent blootgesteld aan ingeademde ziekteverwekkers. In **hoofdstuk 1** van dit proefschrift wordt dieper ingegaan op de anatomie van het luchtwegepitheel en de diverse functies die dit weefsel vervult.

In tegenstelling tot wat in het verleden werd gedacht, levert het luchtwegepitheel een zeer actieve bijdrage aan de lichaamsafweer. Zo worden ingeademde stofdeeltjes (bijvoorbeeld stofmeel en roetdeeltjes) en ziekteverwekkers grotendeels weggevangen door de slijm laag in de luchtwegen. In het luchtwegepitheel bevinden zich trilhaardragende epitheelcellen (**Hoofdstuk 1; Figuur 1**). Door de gesynchroniseerde beweging van deze trilharen kan de slijm laag met weggevangen stofdeeltjes en ziekteverwekkers

kers naar de keelholte vervoerd worden. Ophoesten of inslikken van slijm leidt tot de uiteindelijke verwijdering van stofdeeltjes en ziekteverwekkers. Op deze wijze wordt het overgrote deel van ingeademde stofdeeltjes en ziekteverwekkers uit de luchtwegen verwijderd. Luchtwegepitheelcellen zijn daarnaast in staat om factoren te produceren die antimicrobiële activiteit vertonen. Dit leidt tot de doding van ingeademde microorganismen. Ten slotte kunnen luchtwegepitheelcellen wanneer infectiegevaar dreigt signaalfactoren produceren die het afweersysteem verder kunnen activeren.

Hoewel verschillende eerstelijns afweermechanismen van het luchtwegepitheel zijn beschreven is het nog grotendeels onduidelijk welke factoren en genen van belang zijn voor het op gang brengen van de eerstelijnsafweerreactie. Eén van de meest efficiënte manieren om “spelers” die betrokken zijn bij de eerstelijnsafweerreactie in de luchtwegen te achterhalen, is het toepassen van grootschalige profileringsmethoden waarbij het expressieprofiel van duizenden genen tegelijkertijd bestudeerd kan worden.

DNA EN GENEXPRESSIE

DNA (deoxyribonucleïne zuur) is de drager van het erfelijke materiaal in onze cellen en het bevat alle benodigde genetische informatie om leven mogelijk te maken. Het is opgebouwd uit 4 verschillende bouwstenen, ook wel nucleotiden genoemd: adenine (A), thymine (T), guanine (G) and cytosine (C). Doordat DNA slechts uit 4 bouwstenen bestaat is het molecuul chemische gezien relatief eenvoudig, maar door de enorme omvang van in totaal ongeveer 3,2 miljard bouwstenen is het menselijke DNA zeer complex. Op papier gedrukt zou dit aantal bouwstenen overeenkomen met een telefoonboek bestaande uit ongeveer 200.000 pagina's. Het exacte aantal genen dat het menselijke DNA codeert is nog niet exact bekend maar wordt geschat op ongeveer 25.000-30.000.

Niet alle genen die op het menselijke DNA gecodeerd liggen zijn tegelijkertijd actief. Elke lichaamscel heeft zijn eigen specifieke functies en zijn eigen unieke genenprofiel. Zo is het genenprofiel in een levercel anders dan in een luchtwegepitheelcel. Het genenprofiel in elke lichaamscel wordt mede bepaald door omgevingsfactoren. Verandering in omgevingsfactoren zal dan ook leiden tot aanpassing van het genenprofiel. Omdat de cel doorgaans niet van primaire functie verandert zijn deze veranderingen vaak uiterst subtiel. Slechts een klein aantal genen in het profiel zal veranderen in expressie. De verandering in genexpressie bestaat veelal uit enigszins verhoogde of verlaagde activiteit. Zelden wordt een gen geheel uitgeschakeld of een inactief gen ingeschakeld.

KWANTIFICEREN VAN GENEXPRESSIE

Genetisch onderzoek is een uitermate lastige zaak wanneer nog niet in kaart is gebracht welke genen van belang zijn in het biologische proces van interesse. Zo weten we dat het luchtwegepitheel een belangrijke bijdrage levert aan de afweer in de longen. Maar welke genen zijn nu precies actief in het luchtwegepitheel? En welke genen zijn daadwerkelijk betrokken bij het verzorgen van de epitheliale afweer in de luchtwegen? Beantwoording van deze twee vragen is essentieel om beter inzicht te krijgen in de epitheliale afweer in de longen. Hiervoor zijn technologieën nodig die een onderzoeker in staat stellen om een inventarisatie te maken van genen die actief zijn in de cel. Eveneens moeten deze technologieën de veranderingen in genexpressie kunnen meten, zodat genen gericht geselecteerd kunnen worden ten behoeve van verder onderzoek.

Recent zijn technieken ontwikkeld die het mogelijk maken om op grootschalige wijze het repertoire aan actieve genen in kaart te brengen. De meest gebruikte technologieën zijn Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) en DNA microarray analyse. Beide technieken hebben een breed draagvlak verworven en worden toegepast in zeer uiteenlopende onderzoeksrichtingen. In **hoofdstuk 2** worden de mogelijkheden van deze technieken om het epitheliale afweermechanisme in de luchtwegen te onderzoeken beschreven.

GENEN BETROKKEN BIJ DE EERSTELIJNSAFWEER IN DE LUCHTWEGEN

Om een inventarisatie te maken van het genenprofiel in luchtwegepitheelcellen is in dit onderzoek de SAGE techniek toegepast. In **hoofdstuk 3** wordt beschreven op welke wijze de vroege eerstelijnsafweerreactie in luchtwegepitheelcellen in kaart is gebracht. Hierbij werd gebruik gemaakt van een *in vitro* modelsysteem van gekweekte luchtwegepitheelcellen. Deze luchtwegepitheelcellen werden blootgesteld aan twee verschillende omgevingsfactoren die een eerstelijnsafweerreactie in gang zetten: (i) de bacterie *Pseudomonas aeruginosa* en (ii) de ontstekingsstofstoffen interleukine 1 beta (IL-1 β) en tumor necrose factor alpha (TNF α). Onbehandelde luchtwegepitheelcellen dienden als controle. Na zes uur blootstelling aan deze verschillende omgevingsfactoren werd het genenprofiel in de drie verschillende behandelgroepen bepaald. Per behandelgroep is de identiteit en het expressieniveau van ongeveer 12.500 genen in kaart gebracht. Door het vergelijken van de drie profielen zijn genen in kaart gebracht die als gevolg van de verschillende omgevingsfactoren in expressie waren veranderd. Het expressieniveau van het merendeel van de geïdentificeerde genen bleek onveranderd. Van 292 genen werd wel verschil in genexpressieniveau aangetoond. Deze genen zijn dan ook de kandidaatgenen die mogelijk betrokken zijn bij de epitheliale afweerreactie in de luchtwegen. Vier genfamilies bleken sterk vertegenwoordigd in de groep van genen

die verschillend tot expressie kwamen: (i) keratines, (ii) proteïnase remmers, (iii) S100 calcium-bindende eiwitten en (iv) interleukine-1 familieleden. Opmerkelijk aan deze bevinding was dat het merendeel van deze genen niet eerder geassocieerd werd met de epitheliale afweer in de luchtwegen.

In **hoofdstuk 4** is aandacht besteed aan het verdere onderzoek aan twee genen die binnen de behandelgroepen sterk in expressie verschilden: de calcium-bindende eiwitten S100A8 en S100A9. Uit de bevindingen kwam naar voren dat deze twee genen betrokken zijn bij het in gang zetten van de epitheliale afweerreactie in de luchtwegen. Opmerkelijk was de zeer snelle verhoging van genexpressie en eiwitproductie van S100A8 en S100A9 in luchtwegepitheelcellen na blootstelling aan bacteriën en ontstekingsmediatoren.

VERGELIJKBARE AFWEERMECHANISMEN IN BARRIÈREVORMENDE EPITHEELWEEFSELS

Naast de aanwezigheid in de luchtwegen komen barrièrevormende epitheelweefsels ook op andere plaatsen van het lichaam voor. Ondanks dat barrièrevormende epitheelweefsels zich op verschillende plaatsen in het lichaam bevinden, zoals in de huid en het maagdarmsysteem, is hun afweerfunctie vergelijkbaar. Mogelijke overeenkomsten in de afweerreactie van verschillende epithelia waren niet eerder grootschalig op moleculair niveau onderzocht. Onze hypothese was dat naast fysiologische ook moleculaire overeenkomsten zouden kunnen bestaan. Eén van de epitheliale afweermechanismen is de productie van antimicrobiële eiwitten. Deze eiwitten functioneren als lichaams-eigen antibiotica. In **hoofdstuk 5** is een vergelijkende studie verricht in verschillende lichaamsvloeistoffen naar het patroon van antimicrobiële eiwitten geproduceerd door epitheliale weefsels. Antimicrobiële eiwitten komen in elke lichaamsvloeistof voor, echter wel in verschillende samenstelling.

In **hoofdstuk 6** is een vergelijkende studie verricht naar overeenkomsten in eerste-lijnsafweermechanismen van luchtweg- en huidepitheel. Met behulp van de profilingstechniek SAGE zijn veranderingen in genexpressie gemeten in luchtweg- en huidepitheelcellen die waren blootgesteld aan ontstekingssignaalstoffen. Grote gelijkenis werd gevonden in het genenprofiel dat in deze epitheelceltypen tot expressie kwam. Ook werd overeenkomst gevonden in de genen die in expressie veranderen als gevolg van blootstelling aan ontstekingssignaalstoffen. Deze bevindingen wijzen erop dat vergelijkbare moleculaire mechanismen ten grondslag liggen aan het afweermechanisme dat wordt gebruikt door zowel luchtweg- als huidepitheelcellen. Gebruikmakend van een wiskundig rekenmodel is een aantal genen opgehelderd waarvan de expressie vrijwel alleen voorkomt in epitheelcellen. Deze groep van genen veranderde zowel in

luchtweg- als in huidepitheelcellen wanneer een eerstelijnsafweerreactie *in vitro* werd gesimuleerd. Interessant is dat een aantal van deze genen al eerder in verband was gebracht met fysieke afweermechanismen in de huid. De studie beschreven in **hoofdstuk 6** gaf sterke aanwijzingen dat fysieke versteviging van de epitheliale barrière in de luchtwegen een effectief eerstelijnsafweermechanisme is.

SLOTOPMERKING

De bevindingen beschreven in het proefschrift hebben interessante nieuwe inzichten verschaft in de moleculaire mechanismen van epitheliale afweer in de luchtwegen. Een aanzienlijk aantal genen dat niet eerder geassocieerd was met het epitheliale afweermechanisme in de luchtwegen is geïdentificeerd. Uit deze studies is naar voren gekomen dat fysieke versteviging van de epitheliale barrière in de luchtwegen bijdraagt aan een effectieve afweer tegen respiratoire ziekteverwekkers. Door de expressie van signaalstoffen leveren epitheelcellen een belangrijke bijdrage aan het in gang zetten en controleren van ontstekingsreacties in de luchtwegen. Genen waarvan de expressie vrijwel alleen voorkomt in epitheelcellen zijn uitermate interessant om verder te onderzoeken. Zij betekenen een aantal mogelijke aangrijpingspunten voor de ontwikkeling van geneesmiddelen ter behandeling van ontstekingsaandoeningen in de luchtwegen.