



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Airway epithelial cell cultures for studying obstructive lung disease effects of IL-13 and cigarette smoke

Mertens, T.C.J.

Citation

Mertens, T. C. J. (2018, May 9). *Airway epithelial cell cultures for studying obstructive lung disease effects of IL-13 and cigarette smoke*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62064>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/62064>

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

Cover Page



Universiteit Leiden




The handle <http://hdl.handle.net/1887/62064> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Mertens, Tinne

Title: Airway epithelial cell cultures for studying obstructive lung disease effects of IL-13 and cigarette smoke

Date: 2018-05-09



ADDENDUM
NEDERLANDSTALIGE SAMENVATTING
DUTCH SUMMARY

Astma en COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease of chronisch obstructieve longziekte) zijn beide chronische longaandoeningen die gekenmerkt worden door ontsteking en obstructie van de luchtwegen. Bij astma patiënten is deze obstructie vaak te behandelen, maar bij COPD patiënten is dit vaak onomkeerbaar. Allergisch astma, de meest voorkomende en best gekende vorm van astma, wordt omschreven als een T-helper 2 (Th2)-gedreven aandoening met voornamelijk eosinofiele infiltratie, terwijl bij ontsteking in COPD patiënten voornamelijk CD8 cellen, B cellen, macrofagen en neutrofielen betrokken zijn. Traditioneel worden deze twee aandoeningen, astma en COPD, omschreven als twee verschillende entiteiten. De laatste jaren is het echter duidelijk geworden dat deze aandoeningen heel erg heterogeen zijn. Deze heterogeniteit suggereert dat verschillende moleculaire mechanismen bijdragen aan de variëteit aan ziektebeelden die in de kliniek worden aangetroffen. Het ontrafelen van de onderliggende moleculaire mechanismen kan ons helpen om betere kennis te vergaren om vervolgens de verschillende vormen van astma en COPD beter te kunnen behandelen.

Het slecht functioneren van het luchtweg epitheel, de bekleding van de luchtwegen, is een belangrijk kenmerk van zowel astma als COPD. Het luchtweg epitheel is vervolgens een goede kandidaat voor het moleculair ontrafelen van de verschillende klinische ziektebeelden die we momenteel moeilijk kunnen behandelen. Het luchtweg epitheel vormt een barrière tussen de ingeademde lucht en het onderliggend weefsel, een ideale locatie om aan te kunnen geven wat de effecten zijn van omgevingsblootstellingen en wat er gaande is in het onderliggend weefsel. Daarnaast bevindt het luchtweg epitheel zich op een relatief toegankelijke locatie om een biopsie te nemen. Het verzamelen en analyseren van deze biopsies is niet alleen een bewezen efficiënte methode om cruciale informatie te verzamelen die nodig is voor het stellen van een diagnose, maar in wetenschappelijk onderzoek ook zeer geschikt om moleculaire mechanismen te ontrafelen die ten grondslag liggen aan specifieke ziektebeelden. Daarnaast kunnen biopsies die op verschillende tijdstippen bij een patiënt zijn verzameld een beeld geven over therapeutische effectiviteit in patiënten. Ook kunnen epitheelcellen geïsoleerd worden van luchtweg biopsies of van tijdens een operatie verwijderd longweefsel (longresectie materiaal). Vervolgens kunnen we deze cellen opkweken *in vitro* om moleculaire mechanismen te bestuderen. Daarnaast kunnen deze cellen *in vitro* gebruikt worden om therapeutische effecten te bestuderen op bestaande of geïnduceerde ziektebeelden in de epitheelcellen.

Diermodellen hebben een belangrijke bijdrage geleverd aan onze kennis over chronische

longaandoeningen, maar de huidige diermodellen zijn maar beperkt geschikt voor het voorspellen van therapeutische effecten. Hierdoor is het essentieel dat we van andere preklinische modellen gebruik maken om moleculaire mechanismen te ontrafelen. Deze preklinische modellen zullen uitgebreid geoptimaliseerd en gevalideerd moeten worden, maar ze kunnen enorm bijdragen aan het ontrafelen van de ziektebeelden en het ontdekken van nieuwe therapeutische middelen. Een nadeel van gekweekt luchtweg epitheel dat rechtstreeks is verkregen uit longweefsel, is dat we deze cellen moeilijk genetisch kunnen veranderen door b.v. bepaalde genen uit te schakelen. Dit probleem kunnen we echter omzeilen door gebruik te maken van luchtweg epitheel dat is geïsoleerd uit genetisch gemodificeerde muizen. De huidige technieken laten echter nog niet toe om deze cellen efficiënt te kweken.

De studies in dit proefschrift hebben gebruik gemaakt van *in vitro* modellen om moleculaire mechanismen te ontrafelen die betrokken zijn bij astma en COPD. Geoptimaliseerde kweek methoden en een betere kennis van de onderliggende ziekte mechanismen kunnen helpen in de ontwikkeling van gerichte behandelingen voor deze veel voorkomende chronische longaandoeningen.

In hoofdstuk 2 wordt een uitgebreid literatuur overzicht gegeven over de eigenschappen van luchtweg epitheel in astma en COPD en hoe deze nagebootst kunnen worden gebruik makend van *in vitro* onderzoek met celkweken. Het luchtweg epitheel bestaat uit verschillende types epitheelcellen die elk een eigen specifieke functie hebben, noodzakelijk voor het normaal functioneren van het luchtweg epitheel. Deze verschillende types epitheelcellen kunnen we nabootsen *in vitro* als we deze cellen opkweken op een speciaal membraan dat toelaat dat de cellen aan de bovenkant blootgesteld worden aan lucht, terwijl ze langs de onderkant nutriënten krijgen die zijn opgelost in kweek medium. Dit is in tegenstelling tot het grote merendeel van *in vitro* kweken waarbij de cellen op de bodem van een plastic plaat gekweekt worden, ondergedompeld in een laag kweek medium. Deze klassieke manier van kweken laat de epitheelcellen niet toe om de specifieke celtypes te ontwikkelen die we zien in normaal luchtweg epitheel. Veel eigenschappen van luchtweg epitheel van astma en COPD patiënten kunnen behouden blijven na isolatie van epitheelcellen uit patiënten en het vervolgens opkweken hiervan. Als alternatief kunnen we ook kenmerken van astma en COPD nabootsen door epitheelcellen *in vitro* bloot te stellen aan stoffen die vaak gerelateerd worden aan chronische longaandoeningen zoals interleukin-13 (IL-13) bij astma, en sigaretten rook bij COPD. Tegenwoordig zijn er ook meer complexe varianten van *in vitro*

kweekmodellen beschikbaar waarbij we de omgeving van de epitheelcellen zo veel mogelijk proberen na te bootsten zoals deze in de long is. Dit zijn bijvoorbeeld *in vitro* kweken waarbij meerdere celtypes zoals bijvoorbeeld fibroblasten, endotheelcellen, macrofagen of gladde spiercellen aanwezig zijn in combinatie met de epitheel cellen. Daarnaast bestaan *in vitro* modellen waarbij ook rekening wordt gehouden met de opmaak van de longen zodat we de long als orgaan beter kunnen nabootsen. Deze nieuwe ontwikkelingen kunnen ons helpen bij het beter begrijpen van de complexe omgevingsinteracties met het longweefsel die bijdragen aan de ontwikkeling en progressie van chronische longaandoeningen.

Zoals eerder aangegeven is allergisch astma de meest voorkomende en best gekende vorm van astma. Deze vorm van astma wordt omschreven als een T-helper 2 (Th2)-gedreven aandoening. IL-13 is een belangrijk Th2 cytokine dat een centrale rol speelt bij allergische astma. Een aantal jaar geleden is door middel van genetische analyse van verschillende patiënten met allergisch astma, een specifieke signatuur van genen ontdekt die kenmerkend is voor de aanwezigheid van allergisch astma in patiënten. Deze specifieke signatuur, ook wel Th2-signatuur genoemd, is aanwezig in luchtweg epitheel en kan nagebootst worden *in vitro* door de epitheelcellen bloot te stellen aan IL-13. In hoofdstuk 3 hebben we gebruik gemaakt van deze *in vitro* opstelling om te kijken of deze Th2-signatuur gevoelig is voor de behandeling van macrolide antibiotica. Zo is het aangetoond dat azitromycine, een macrolide antibioticum, niet effectief is allergisch astma, maar wel in een andere vorm van astma, neutrofiel astma. Onze resultaten gaven aan dat azitromycine een differentieel effect had op de Th2-signatuur, waarbij de expressie van een aantal genen onderdrukt werden terwijl de expressie een ander gen extra werd opgedreven. De gevolgen van deze differentiële effecten moeten nog onderzocht worden, maar dit kan wel een mogelijke indicatie zijn waarom azitromycine effectief is in neutrofiele astma in tegenstelling tot allergische astma.

Een aantal astma patiënten rookt waardoor ze vaak ongevoelig worden voor de standaard behandeling inhalatie steroïden. Daarnaast kan sigarettenrook de symptomen van astma verergeren, zorgen voor een snellere afname van de longfunctie en verhoogt het de kans op longaanvallen (exacerbaties). Omdat we in hoofdstuk 3 hebben aangetoond dat de Th2-signatuur gevoelig kan zijn voor behandeling, hebben we vervolgens in hoofdstuk 4 gekeken hoe sigaretten rook de Th2-signatuur kan beïnvloeden. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van de *in vitro* kweken waarbij we de cellen blootstellen aan lucht, in combinatie met IL-13 en sigaretten rook die we door middel van een gespecialiseerde opstelling genereren om een zo relevant mogelijke blootstelling na te bootsen. Ook hier zien we dat sigarettenrook een

differentieel effect heeft op de IL-13-geïnduceerde Th2-signatuur. Daarnaast zagen we ook dat de Th2-signatuur niet herstelt als we de sigarettenrook blootstelling stoppen voor een aantal dagen. Aangezien de Th2-signatuur een indicatie is voor de gevoeligheid van allergisch astma patiënten voor inhalatie steroïden, kan dit mogelijk helpen om te verklaren waarom rokende astma patiënten ongevoelig kunnen worden voor deze standaard behandeling.

Een acute longaanval in COPD patiënten wordt gekenmerkt door een aanhoudende verslechtering van de patiënt, die vaak tot een ziekenhuisopname leidt. Zowel bacteriële als virale infecties hebben een belangrijke bijdrage aan het induceren van deze longaanvallen. Het luchtweg epitheel vormt een mechanische barrière voor geïnhaleerde stofdeeltjes en microben, maar het is ook in staat om een immuun reactie uit te lokken die belangrijk is bij het uiteindelijk verwijderen van de schadelijke deeltjes en microben. Het is eerder aangetoond dat sigarettenrook de luchtwegen gevoeliger kan maken voor infecties. Om beter te begrijpen hoe sigarettenrook dit effect tot stand brengt hebben we in hoofdstuk 5 onderzocht hoe sigarettenrook een infectie van epitheelcellen *in vitro* beïnvloed. Daarnaast hebben we ook onderzocht of epitheelcellen geïsoleerd uit COPD patiënten anders reageren op gecombineerde blootstelling aan sigarettenrook en microben dan epitheel cellen uit patiënten zonder COPD. Onze resultaten gaven aan dat sigarettenrook een differentieel effect heeft op virale en bacteriële immuun reacties van de epitheelcellen. Daarnaast hebben epitheelcellen van COPD patiënten een verminderde antivirale reactie dan epitheelcellen van patiënten zonder COPD, wat suggereert dat tijdens de ontwikkeling van COPD epigenetische veranderingen optreden in het luchtweg epitheel. Een verminderde antivirale reactie kan er vervolgens toe leiden dat de patiënt meer vatbaar is voor virale infecties.

Humaan luchtweg epitheel is niet altijd beschikbaar voor onderzoek. Daarnaast staan epitheelcellen ervoor bekend dat ze moeilijk genetisch te veranderen zijn wat onderzoek, gebruik makend van deze cellen, vaak lastig maakt. Een alternatief hiervoor is het tracheaal epitheel van een muis dat grote overeenkomsten heeft met het luchtweg epitheel dat we aantreffen in humane longen. Indien we de epitheel cellen uit een trachea van een transgene muis isoleren, dan voorkomen we de noodzaak om de cellen *in vitro* genetisch te moeten manipuleren. Een belangrijk probleem hierbij is echter dat de huidige protocollen om deze cellen te isoleren heel erg inefficiënt zijn. Zo zijn tientallen muizen nodig voor een enkel "*in vitro*" experiment met muis tracheaal epitheel om voldoende cellen te hebben. In hoofdstuk 6 is er een nieuwe kweekmethode ontwikkeld waarmee je met slechts twee muizen meerder

experimenten kan uitvoeren. Door middel van aangepaste kweekmedia waren we in staat om de geïsoleerde cellen *in vitro* te expanderen, wat voorheen niet mogelijk was, alvorens deze te gebruiken voor experimenten.

Tot slot wordt er in hoofdstuk 7 een bredere context gegeven, gebaseerd op de voorgaande hoofdstukken. Deze discussie is opgedeeld in drie onderdelen. Als eerste is besproken hoe *in vitro* modellen opgesteld kunnen worden en waarmee er rekening gehouden moet worden. *In vitro* modellen kunnen een uiterst complexe opmaak hebben, maar de keerzijde hiervan is dat deze modellen zeer moeilijk te reproduceren zijn. Bijgevolg is het belangrijk om de gulden middenweg te vinden tussen complexiteit en reproduceerbaarheid om vervolgens de resultaten in een duidelijke verband te kunnen plaatsen. Vervolgens is er in de algemene discussie besproken of het al dan niet mogelijk is om patiënt resultaten en responsen op therapeutische middelen te voorspellen gebruik makend van *in vitro* kweken van luchtweg epitheel. Hoewel dit op termijn mogelijkheid zou kunnen bieden om patiënten beter te karakteriseren om vervolgens gepersonaliseerde medicatie te geven, is het noodzakelijk dat we astma en COPD eerst beter begrijpen. Tot slot wordt er in het laatste onderdeel dieper in gegaan op de huidige muis modellen voor chronische longaandoeningen, en hoe we deze anders kunnen indelen om ze een beter voorspellend vermogen te geven. De huidige muismodellen voor chronische longaandoeningen zoals astma en COPD hebben een slecht voorspellende waarde voor de effectiviteit van nieuwe therapeutische middelen. Hoewel muis en humane longen sterk van elkaar verschillen, is een belangrijk probleem dat we astma en COPD nog steeds niet helemaal begrijpen. Daarnaast zijn zowel astma als COPD heel heterogene aandoeningen die moeilijk te reproduceren zijn in muismodellen. Bijgevolg is het belangrijk dat we de bestaande muis modellen toespitsen aan specifieke ziektebeelden binnen astma en COPD in tegenstelling tot ze onder een gezamenlijk gedeelde noemer plaatsten.

De onderzoeken in dit proefschrift waren toegewijd aan het ontwikkelen en toepassen van *in vitro* modellen die kunnen bijdragen aan onze kennis omtrent astma en COPD. Er is gebruik gemaakt van een *in vitro* model waarin een epitheliale Th2-signatuur kan worden nagebootst, en waarmee kan worden onderzocht hoe deze signatuur beïnvloed kan worden door externe factoren zoals medicijnen en sigarettenrook. Hoewel deze modellen kunnen helpen bij het voorspellen van klinische responsen, moeten ze nog wel extensief gevalideerd worden. Daarnaast hebben we ook gekeken naar de mogelijkheid om acute exacerbaties *in vitro* te modelleren. Dit model zou uiteindelijk belangrijk kunnen zijn voor

de identificatie en het bestuderen van biomarkers voor exacerbaties, en hoe deze beïnvloed kunnen worden door externe factoren. Ook hebben we een *in vitro* model geoptimaliseerd dat toelaat om efficiënt muis tracheaal epitheel te kweken. Hoewel deze *in vitro* modellen geen volledig beeld geven van de humane modellen, hebben ze wel het voordeel dat deze uit transgene dieren geïsoleerd kunnen worden. Daarnaast draagt de ontwikkeling van dit muis kweekmodel bij aan een reductie in het aantal dierproeven vanwege de efficiënte wijze waarop epitheel kan worden geïsoleerd en gekweekt. Ook kunnen pilot experimenten in het muismodel onnodige proefdierexperimenten voorkomen. Tenslotte kan door een rechtstreekse vergelijking van het muis en het humane kweekmodel een betere vertaling worden gemaakt van proeven verkregen in muismodellen naar de patiënt.

Het bestuderen van luchtweg epitheel kan ons belangrijke aanwijzingen geven voor het beter begrijpen van ziekte mechanismen, onderliggend aan chronische longaandoeningen. Dit kan uiteindelijk leiden tot de ontwikkeling van nieuwe therapeutische middelen, maar ook van nieuwe biomarker profielen. Het gebruik van luchtweg epitheel en hun biomarkers kan significant bijdragen aan onze kennis over de verschillende vormen van astma en COPD.

