



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Airway epithelial innate host defence in chronic obstructive pulmonary disease

Amatngalim, G.D.

Citation

Amatngalim, G. D. (2018, October 11). *Airway epithelial innate host defence in chronic obstructive pulmonary disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66122>

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/1887/66122>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66122> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Amatngalim, G.D.

Title: Airway epithelial innate host defence in chronic obstructive pulmonary disease

Issue Date: 2018-10-11

ADDENDUM

Nederlandstalige samenvatting

List of publications

Curriculum vitae

Dankwoord

NEDERLANDSTALIGE SAMENVATTING

Onze longen hebben de essentiële taak om via de ademhaling te zorgen voor de uitwisseling van zuurstof en koolstofdioxide. Deze uitwisseling van gassen is verstoord in patiënten met COPD (chronic obstructive pulmonary disease; chronische obstructieve longziekte), een longziekte die wordt gekenmerkt door blijvende schade aan de longblaasjes en luchtwegen, en vaak gepaard gaat met een ophoping van slijm in de luchtwegen. Deze beide ziektebeelden, die leiden tot een afname in de functie van de longen, worden respectievelijk emfyseem en chronische bronchitis genoemd. Roken is de voornaamste risicofactor voor de ontwikkeling van COPD. Echter, niet alle rokers ontwikkelen de ziekte, wat aanduidt dat bijkomende genetische en omgevingsfactoren een rol spelen. Naast symptomen als kortademigheid, vermoeidheid en ophoesten van slijm, wordt COPD gekenmerkt door een verhoogde gevoeligheid voor luchtweginfecties. Infecties door schadelijke bacteriën (en virussen) dragen bij aan de ontwikkeling van ontsteking en blijvende schade aan het longweefsel. Het oplopen van een luchtweginfectie kan daarnaast leiden tot een longaanval, waarbij de functie van de longen in zeer korte tijd scherp achteruitgaat en zelfs kan leiden tot de dood van een patiënt. Naast patiënten met COPD hebben ook rokers een verhoogd risico op het krijgen van een luchtweginfectie. Dit suggereert dat er een causaal verband is, waarbij roken zorgt voor een onderdrukking van afweermechanismen in de longen. Welke afweermechanismen verstoord zijn, is echter grotendeels onduidelijk. Om deze reden is fundamenteel onderzoek naar de moleculaire en cellulaire afweerprocessen in de longen en de luchtwegen van groot belang. Dit is ook belangrijk omdat het kan leiden tot nieuwe inzichten hoe infecties in COPD behandeld kunnen worden.

In gezonde longen zorgt het slijmvlies van de luchtwegen voor de voornaamste afweer tegen bacteriën. Het slijmvlies bestaat uit een laag luchtwegepitheel, dat zorgt voor het filteren van ingeademde lucht tijdens het transport naar de longblaasjes. Het luchtwegepitheel bestaat uit verschillende soorten cellen met ieder een eigen unieke functie. Secretoire epitheelcellen, bestaande uit slijmbeker (goblet)- en clubcellen, zorgen voor de aanmaak van een dunne laag slijm op het oppervlak van het epitheel. Aan dit slijm blijven bacteriën en andere ingeademde micro-organismen en deeltjes kleven, wat leidt tot het zuiveren van ingeademde lucht. Trilhaarepitheelcellen zorgen voor het verwijderen van het slijm uit de luchtwegen naar de keel, een continu “zelfreinigend” proces dat vergelijkbaar is met de werking van een lopende band. Naast de aanmaak en het verwijderen van slijm, bieden luchtwegepitheelcellen ook bescherming tegen infecties door het produceren van antimicrobiële eiwitten. Dit zijn moleculen die bacteriën doden of de groei van bacteriën remmen, en die dus kunnen worden gezien als de lichaamseigen antibiotica. Naast de aanmaak van een beperkte hoeveelheid antimicrobiële eiwitten door epitheel dat niet wordt geprikkeld, vertoont het epitheel een verhoogde productie van deze eiwitten na het herkennen van bacteriën door speciale receptoren. Deze verhoogde productie treedt voornamelijk op bij de nesteling en groei van bacteriën in de luchtwegen en deze bacteriën en andere micro-organismen zorgen ook voor de aanmaak van ontstekingsfactoren door het epitheel. De ontstekingsfactoren zorgen voor het aantrekken van afweercellen uit het bloed naar het ontstoken weefsel. Deze afweercellen voorkomen de verdere verspreiding van een luchtweginfectie naar het longweefsel, door bacteriën te doden en op te ruimen.

In intact epitheel zorgen secretoire- en trilhaarcellen voor de voornaamste verdediging door het epitheel. Ernstige schade aan het epitheel, bijvoorbeeld door roken of tijdens een infectie, kan echter leiden tot celdood van secretoire- en trilhaarcellen. Herstel van het epitheel is in dit geval cruciaal, om infecties van het onderliggende longweefsel te voorkomen. Naast secretoire- en trilhaarcellen, bestaat het epitheel ook uit een groep stamcellen. Deze cellen bevinden zich op het basaal membraan, de scheidlijn tussen het epitheel en het onderliggende bindweefsel, en worden daarom basaal cellen genoemd. In tegenstelling tot secretoire en – trilhaarcellen, kunnen basaal cellen zich vermenigvuldigen en transformeren tot nieuwe secretoire- en trilhaarcellen, aan de hand van een proces wat differentiatie genoemd wordt. In onbeschadigd epitheel zijn basaal cellen niet actief, echter bij epitheelschade zorgen ze voor herstel van de epitheel laag en tevens voor het aantrekken van afweercellen uit het bloed. Bij het herstel van het epitheel zorgen basaal cellen eerst voor het sluiten van een epitheelwond, door cel migratie en vermenigvuldiging van het aantal basaal cellen. Daarna differentieert een aantal basaal cellen tot secretoire- en trilhaarcellen.

Het luchtwegepitheel heeft dus een zeer belangrijke rol in de afweer tegen bacteriën in gezonde longen. De vraag is of onderdrukking van de functies van epitheel een rol speelt in de ontwikkeling van COPD. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat verstoring van de aanmaak en verwijdering van slijm in de luchtwegen (vooral in de kleine luchtwegen) een belangrijke oorzaak is van de ontwikkeling van COPD door chronische bronchitis. Een verhoogde slijmproductie en afname in de trilhaarfunctie van het epitheel, die samen leiden tot de ophoping van slijm in de luchtwegen, wordt in eerste instantie geprikkeld door het roken van sigaretten. Echter na verloop van tijd zijn deze veranderingen als het ware geprogrammeerd in de epitheelcellen, wat leidt tot een blijvende ophoping van slijm in de luchtwegen. Er wordt verondersteld dat dit plaatsvindt door het aanhouden van een vicieuze cirkel van roken, infecties en longschade. In deze vicieuze cirkel zorgt slijmophoping door roken voor de nesteling en groei van bacteriën in de luchtwegen. De daaropvolgende detectie van bacteriën door receptoren op het epitheel leidt tot de productie van ontstekingsfactoren, die zorgen voor de aantrekking van afweercellen uit het bloed. Alhoewel deze cellen normaal gesproken cruciaal zijn voor de afweer tegen micro-organismes, zorgen ze tijdens chronische ontsteking voor schade aan het longweefsel. Veranderingen in de aanmaak en afvoer van slijm door het epitheel vormen dus een belangrijk mechanisme in de ontwikkeling van COPD. Het is evenwel onduidelijk hoe bacteriën de luchtwegen kunnen koloniseren, ondanks de aanwezigheid van afweercellen uit het bloed. Dit kan mogelijk verklaard worden door een verandering in de aanmaak van antimicrobiële eiwitten door het luchtwegepitheel. Of en hoe dit proces verstoord is tijdens de ontwikkeling van COPD, is grotendeels onduidelijk. In dit proefschrift is daarom onderzocht of het roken van sigaretten leidt tot een afname in de productie van antimicrobiële eiwitten door het luchtwegepitheel, en of epitheelcellen van COPD patiënten een verminderde antibacteriële activiteit hebben. Naast deze vraagstelling is onderzocht of het epitheel nog andere afweerfuncties heeft die mogelijk verstoord zijn in COPD patiënten of door het roken van sigaretten. Dit is onderzocht door verschillende vormen van afweer door het epitheel te bestuderen: i) epitheel afweerfuncties die continu actief zijn en dus voor een basale vorm van afweer zorgen, ii) een afweer na nesteling en groei van bacteriën gedurende een infectie en iii) afweer door basaal stamcellen na schade aan het epitheel.

De afweer door het luchtwegepitheel is onderzocht aan de hand van experimenten met gekweekte cellen. Naast celkweken met alleen basaal cellen, is er ook gebruik gemaakt van een kweekmodel met gedifferentieerde luchtwegepitheelcellen. Hierin worden basaal cellen gekweekt in lucht-blootgestelde condities, wat leidt tot differentiatie in secretoire en trilhaarcellen. De afweerfuncties van het gekweekte epitheel zijn bestudeerd na blootstelling aan sigarettenrook, stimulatie met bacteriën en na het beschadigen van het epitheel. Door epitheelcellen van COPD patiënten te vergelijken met het epitheel van rokers zonder COPD, probeerden we meer inzicht te krijgen in het eventuele verschil tussen deze twee groepen.

In hoofdstuk 2 is er literatuur vooronderzoek gedaan naar de rol van antimicrobiële eiwitten in de ontwikkeling van COPD. Eerdere studies wijzen erop dat het luchtwegepitheel mogelijk minder antimicrobiële eiwitten produceert door schadelijke effecten van het roken. Dit was medebepaald aan de hand van experimenten met gekweekt luchtwegepitheel, blootgesteld aan sigarettenrook. Daarnaast is in studies met luchtwegweefsels van COPD patiënten aangetoond dat ook na het stoppen met roken er een verlaagde expressie van antimicrobiële eiwitten waarneembaar was. In tegenstelling tot de productie van antimicrobiële eiwitten door het epitheel, is er een toename van vergelijkbare eiwitten geproduceerd door afweercellen uit het bloed. Dit is het gevolg van chronisch ontsteking in de luchtwegen van COPD patiënten. Het type antimicrobiële eiwitten van afweercellen uit het bloed en epitheelcellen verschilt niettemin van elkaar. Daarnaast wordt verondersteld dat de eiwitten van afweercellen uit het bloed bijdragen aan longschade in COPD. Kort samengevat, tonen eerder uitgevoerde studies dus aan dat er een verschuiving is in de balans van het type antimicrobiële eiwitten in de longen van rokers en COPD patiënten. Waar, in het geval van het epitheel, een verminderde productie mogelijk bijdraagt aan een verhoogde gevoeligheid voor infecties.

Aangezien het onduidelijk was of basaal cellen een andere afweeractiviteit vertonen ten opzichte van intact gedifferentieerd epitheel is dit in hoofdstuk 3 onderzocht. Dit onderzoek werd uitgevoerd aan de hand van een vergelijking van gekweekte basaal cellen en gedifferentieerd luchtwegepitheel, beide gestimuleerd met bacteriën. Zowel basaal cellen en gedifferentieerd luchtwegepitheelcellen vertoonden een toename in expressie van bepaalde antimicrobiële eiwitten na blootstelling aan bacteriën. Echter naast een overlap, observeerden we dat alleen basaal cellen in staat waren om een specifiek antimicrobieel eiwit te produceren. Dit eiwit, genaamd RNase 7, was in eerdere studies omschreven als een belangrijke beschermer tegen infecties van bacteriën op de huid. Naast een verhoogde expressie na bacterie stimulatie, vonden we dat RNase 7 ook geproduceerd werd door basaal cellen na schade van intact epitheel door sigarettenrook. Dit proces bleek onderdeel te zijn van het epitheelherstel proces, waarbij activatie van een bepaalde receptor, de epidermal growth factor receptor (EGFR), betrokken was. Samenvattend hebben we in deze studie aangetoond dat basaal cellen in het luchtwegepitheel, naast een stamcelfunctie, ook een mogelijke bijdrage leveren aan de afweer tegen bacteriën door de aanmaak van het antimicrobiële eiwit RNase 7.

In hoofdstuk 4 is er onderzocht of de aanmaak van antimicrobiële eiwitten na bacterie blootstelling anders was in gedifferentieerd luchtwegepitheel van COPD patiënten, vergeleken met cellen van rokers zonder COPD. Bij dit onderzoek bleek inderdaad dat epitheelcellen van COPD patiënten een verminderde genexpressie hadden van de antimicrobiële eiwitten β -defensin 2 en S100A7. Overeenkomend met dit resultaat, zagen we in andere experimenten een verminderde antibacteriële activiteit van gekweekte COPD epitheelcellen ten opzichte

van rokers zonder COPD. In zowel epitheel van COPD patiënten als van rokers, vonden we een remmende werking van sigarettenrook op de expressie van antimicrobiële eiwitten. Maar in tegenstelling tot de afname van antimicrobiële eiwitten, veroorzaakte sigarettenrook samen met bacterie blootstelling een toename in ontstekingsfactoren. Dit geeft dus aan dat het roken van sigaretten een tegengestelde werking heeft op de afweerfunctie van het epitheel, waarbij er een afname is in antibacteriële activiteit en een toename in ontsteking. Dit effect komt overeen met de toename in de gevoeligheid voor infecties, en chronische ontsteking in de luchtwegen, in zowel COPD patiënten als rokers.

Hoofdstuk 5 omschrijft een studie waar de invloed van roken onderzocht werd op de productie van antimicrobiële eiwitten tijdens de differentiatie van basaal cellen. In dit hoofdstuk tonen we eerst aan dat gedifferentieerde luchtwegepitheelcellen een bepaalde groep antimicrobiële eiwitten specifiek aanmaakt, die nauwelijks geproduceerd worden in basaal celkweken. Gedurende de differentiatie van basaal cellen onderdrukt sigarettenrook niet alleen de epitheeldifferentiatie, maar (daarmee) ook de aanmaak van deze eiwitten, wat leidt tot een verminderde antibacteriële activiteit van het epitheel. Deze studie toont dus een direct verband aan tussen de onderdrukking van de differentiatie van het luchtwegepitheel door sigarettenrook en de afweer tegen bacteriën door antimicrobiële eiwitten.

In hoofdstuk 6 wordt de invloed van sigarettenrook op het herstel het epitheel verder bestudeerd. Hier is gebruik gemaakt van epitheelschademodelen, waarin het epitheel mechanisch verwond werd, of waarbij de verbindingen tussen epitheelcellen tijdelijk verbroken werden door calcium weg te nemen. In beide modellen vonden we dat sigarettenrook zorgde voor een afname in epitheelherstel. In tegenstelling tot deze afname in het herstel, vonden we dat sigarettenrook de ontstekingsreactie en afweer door basaal cellen juist verhoogde. Dit werd veroorzaakt door oxidatieve stress, veroorzaakt door sigarettenrook. Kort samengevat toont deze studie aan dat sigarettenrook een tegengestelde werking heeft op het epitheel tijdens schade, waarin het herstel geremd wordt en ontsteking juist toeneemt.

In hoofdstuk 7 wordt de invloed van roken op activatie van de integrated stress response (ISR) in luchtwegepitheelcellen bestudeerd. ISR is een cellulair mechanisme dat mede bepaalt of een cel na het oplopen van schade in leven blijft of doodgaat. In het onderzoek vonden we dat ISR geactiveerd werd in gekweekt luchtwegepitheel na blootstelling aan sigarettenrook. Dit effect was sterker in het epitheel van COPD patiënten dan in het epitheel van rokers zonder COPD. Daarnaast vonden we een negatieve relatie tussen de expressie van bepaalde eiwitten gerelateerd aan de ISR en de longfunctie van patiënten. Deze bevindingen suggereren dat een toename van de ISR door het roken mogelijk een rol speelt in de ernst van COPD. Echter hoe dit precies in zijn werk gaat moet nog verder onderzocht worden.

In hoofdstuk 8 wordt er verder onderzocht hoe sigarettenrook ontsteking- en wondherstelresponsen door het luchtwegepitheel beïnvloedt. In dit hoofdstuk hebben we specifiek gekeken naar de werking van het eiwit ADAM17, wat betrokken is bij het vrij knippen van ontsteking- en groeifactoren die zich op het oppervlak van het epitheel bevinden. Blootstelling van luchtwegepitheelcellen aan sigarettenrook bevorderde de activiteit van ADAM17, wat leidde tot het vrij knippen van soluble IL-6 receptor (sIL-6R) en amphiregulin, respectievelijk een ontstekings- en groeifactor. De activiteit van ADAM17 was hoger in

luchtwegepitheel cellen van COPD patiënten ten opzichte van rokers zonder COPD. Daarom is het goed mogelijk dat dit mechanisme een rol speelt bij de ontwikkeling van ontsteking en verstoring van het epitheelherstel in COPD.

Naast ontstekingsfactoren produceren luchtwegepitheelcellen ook moleculen die ontsteking in de longen kunnen remmen. Hoofdstuk 9 omschrijft een studie waarin de expressie van een mogelijk nieuw ontstekingsremmend eiwit, WFDC12, onderzocht is. Basaal cellen, maar niet gedifferentieerde epitheelcellen, vertoonden een verhoogde expressie van WFDC12 na stimulatie met bacteriën. Ten opzichte van basaal cellen hebben gedifferentieerde cellen echter een intrinsiek hoge expressie van WFDC12, wat onderdrukt kon worden na stimulatie met de groeifactor TGF- β 1. Aangezien voorgaande studies hebben aangetoond dat expressie van TGF- β 1 verhoogd is in luchtwegepitheelcellen van COPD patiënten, is het dus mogelijk dat TGF- β 1 voor een onderdrukking zorgt van WFDC12 in COPD. Dit wordt ondersteund in experimenten waarin we de expressie van WFDC12 hebben vergeleken in gekweekt luchtwegepitheel van COPD patiënten en rokers zonder COPD. Uit deze vergelijking bleek inderdaad dat de expressie van WFDC12 lager was in celkweken van COPD patiënten ten opzichte van rokers zonder COPD. Daarbij vonden we een correlatie tussen de mate van WFDC12 expressie en longfunctie. Vervolgonderzoek is nodig om te onderzoeken of de verlaagde expressie van WFDC12 bijdraagt aan ontstekingsreactie in de luchtwegen van COPD patiënten.

In hoofdstuk 10 is uiteengezet hoe een afname in de expressie en functie van antimicrobiële eiwitten in COPD en andere longziekten behandeld zouden kunnen worden. Hier wordt aandacht besteedt aan mogelijk therapieën met synthetische antimicrobiële eiwitten of daarvan afgeleide moleculen. Daarnaast wordt de mogelijkheid besproken om de productie van antimicrobiële eiwitten door cellen in de longen therapeutisch te bevorderen.

De studies in dit proefschrift hebben geleid tot nieuwe inzichten in de afweermechanismen van het luchtwegepitheel. Hierin kunnen we onderscheid maken in specifieke afweermechanismen van gedifferentieerde, secretoire en trilhaarepitheelcellen, en basaal cellen. Er is daarnaast onderzocht hoe deze mechanismen beïnvloed kunnen worden door het roken van sigaretten, of persistent aanwezig zijn in het epitheel van COPD patiënten. Sigarettenrook onderdrukt de expressie van antimicrobiële eiwitten van het gedifferentieerde epitheel. Daarnaast hebben luchtwegcellen van COPD patiënten een intrinsiek verlaagde antibacteriële activiteit vergeleken met rokers zonder COPD. In tegenstelling tot antimicrobiële eiwitten, is de expressie van ontstekingsfactoren verhoogd. Deze bevinding geeft aan dat er in het epitheel sprake is van een disbalans in afweermechanismen die bijdragen aan een verhoogde gevoeligheid voor infecties en de ontwikkeling van chronische ontsteking in de longen. Sigarettenrook zorgt naast veranderingen in de afweerreacties en verstoring van deze balans, ook voor schade aan het epitheel. Ondanks onderdrukking van epitheel herstelfuncties, is er een toename in productie van ontstekingsfactoren, mogelijk door toedoen van de basaal cellen. Deze bevindingen geven aan dat de ontwikkeling van ontsteking selectief in stand wordt gehouden tijdens schade en herstel van het luchtwegepitheel.

In navolging van ophoping van slijm, is er dus ook een onderdrukking van andere afweermechanismen door het luchtwegepitheel, die mogelijk bijdragen aan de verhoogde gevoeligheid voor bacteriële luchtweginfecties. De indirecte afweer, waarin afweercellen uit

het bloed worden aangetrokken door ontstekingsfactoren, blijft desondanks in stand. Het roken van sigaretten zorgt dus voor de ontwikkeling van de vicieuze cirkel van infecties, ontsteking en schade, waarbij het luchtwegepitheel een centrale rol speelt. Een afname in directe afweermechanismen, en een toename in productie van ontstekingsfactoren, lijken beide direct verbonden met het oplopen van schade en afwijkend herstel van het epitheel door roken. Therapieën die gericht zijn op de bevordering van het herstel van het epitheel kunnen dus mogelijk leiden tot een verlaagde gevoeligheid voor infecties en onderdrukking van ontsteking. Ter aanvulling kan de verminderde expressie van antimicrobiële eiwitten behandeld worden door therapieën met synthetische antimicrobiële eiwitten of daarvan afgeleide moleculen.