

University of Groningen

Epithelial and subepithelial players in chronic intestinal disease

Cui, Yingying

DOI:
[10.33612/diss.127963656](https://doi.org/10.33612/diss.127963656)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Cui, Y. (2020). *Epithelial and subepithelial players in chronic intestinal disease*. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.127963656>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

De primaire barrière in de humane darm wordt gevormd door het darmepitheel en de subepitheliale lagen. Deze vervullen 2 hoofdfuncties: 1) opname van essentiële voedingsstoffen uit de voeding, maar tegelijkertijd 2) bescherming tegen potentieel schadelijke stoffen en/of infectieuze microben in het darmlumen. Veel chronische ziekten zijn geassocieerd met de toxische effecten van deze schadelijke stoffen op het darmepitheel en de subepitheliale lagen en leiden tot darmstoornissen, zoals darmkanker, chronische darmontsteking en fibrose. Het roken van sigaretten is een bekende risicofactor voor het ontwikkelen van darmkanker en chronische darmontsteking, zoals in de ziekte van Crohn (CD). Het is echter minder bekend dat rokende mensen vaak hogere concentraties van stofjes uit sigarettenrook in het darmlumen hebben dan in de bloedbaan. Dit is dus een ernstige bedreiging voor het darmepitheel en de subepitheliale lagen. Hoe sigarettenrook rechtstreeks de werking van menselijke darmepitheel- en subepitheliale cellen kan beïnvloeden, is echter niet echt duidelijk. Roken leidt tevens tot een ernstiger ziekteverloop van CD, dat wordt gekenmerkt door een hoger risico op het ontwikkelen van littekenvorming, oftewel fibrose, in de darm. Dit proefschrift richt zich op het effect van sigarettenrook op het menselijke darmepitheel en subepitheliale cellen (voornamelijk de myofibroblasten) en analyseerde het effect van een antifibrotisch medicijn, pirfenidon, op het fibrogene potentieel van intestinale myofibroblasten.

In hoofdstuk 2 werd gebruik gemaakt van menselijke darmorganoiden en driedimensionale (3D) Caco-2-celmodellen om de effecten van een totaal extract van sigarettenrook (CSE) op epitheliale cel morfogenese, regeneratie, polariteit en barrièrefunctie te onderzoeken. We laten zien dat blootstelling van darmepitheelcellen aan CSE resulteerde in een defecte proliferatieve en differentiatie functie van intestinale stamcellen en een verminderde polarisatie van intestinale enterocyten, wat leidde tot afwijkende intestinale cel morfogenese en functioneren. De door CSE veroorzaakte effecten werden doorgegeven aan cellen van de volgende generatie en bleken tevens onomkeerbare effecten te veroorzaken. CSE verstoorde echter niet de

ontwikkeling van de epitheliale polariteit en verminderde ook niet de epitheliale barrièrefunctie van organoïden, wat suggereert dat intestinaal epitheelweefsel resistenter is tegen CSE-blootstelling dan longepitheelweefsel. Bovendien verstoort CSE de morfogenese en polariteit van reeds gevormde Caco-2-sferoïden niet, wat suggereert dat de effecten van CSE op intestinale enterocyten relevant kunnen zijn voor de morfogenese en het herstel van de polariteit, zoals tijdens de regeneratieve wondgenezingsproces. Deze studie toont aan dat een kortdurende blootstelling van intestinale epitheelcellen aan CSE lange termijn effecten kan hebben die mogelijk ten grondslag liggen aan het verhoogde risico op het ontwikkelen van darmkanker.

Het roken van sigaretten is ook een risicofactor voor het ontstaan van chronische darmontsteking, zoals bij CD. In hoofdstuk 3 analyseerden we het effect van roken van sigaretten/CSE op de expressie van vasculair adhesie-eiwit-1 (VAP-1; een eiwit gecodeerd door het gen *AOC3*) in darmweefsel van CD patiënten en primaire menselijke darmfibroblasten (p-hIF's) om te onderzoeken of het immunomodulerende VAP-1 betrokken is bij het ontwikkelen van darmontsteking en/of fibrose. *AOC3* expressie in de dikke darm was significant hoger bij CD patiënten die roken in vergelijking met niet-rokende CD patiënten. We ontdekten dat *AOC3* expressie in de dikke darm van CD-patiënten sterk correleerde met *COL1A1* en *ACTA2* expressie (dat zijn merkers van fibrose). Overeenkomstig, VAP-1 co-lokaliseerde met α SMA (het eiwit dat wordt gecodeerd door *ACTA2*) in de intestinale subepitheliale myofibroblasten, die voornamelijk tot expressie kwam in fibrotische gebieden. In overeenstemming met de patiëntgegevens werd *AOC3*-expressie verhoogd wanneer primaire humane intestinale fibroblasten (p-hIF's) werden blootgesteld aan CSE, maar het veranderde de *COL1A1* en *ACTA2* expressie niet in deze cellen. Deze resultaten suggereren dat sigarettenrook de darmontsteking verergert en daardoor de fibrogenese van de dikke darm bij CD bevordert door immunomodulerende VAP-1 te induceren in intestinale fibroblasten, maar niet door het fibrogene fenotype van deze cellen rechtstreeks te versterken.

Als extra spin-off van Hoofdstuk 3 hebben we een nieuw subtype entero-endocriene cellen in de menselijk darm geïdentificeerd en gekarakteriseerd die

immunomodulerende VAP-1 tot expressie brengen. Naast typische VAP-1-kleuring van de mucosale endotheelcellen, gladde spiercellen en subepitheliale myofibroblasten, hebben we in hoofdstuk 4 enkele VAP-1⁺ intestinale epitheelcellen (IEC) waargenomen in de gezonde dikke darm, ileum en jejunum en bij niet-ontstoken, ontstoken en stenotisch colonweefsel van patiënten met inflammatoire darmziekten (IBD), zowel patiënten met CD als patiënten met colitis ulcerosa (CU). Door immunohistochemische analyse van seriële weefselcoupes en immunofluorescentie co-kleuring, tonen we aan dat VAP-1 tot expressie wordt gebracht in een subtype van chromogranine A⁺ enteroendocriene cellen. *In vitro* detecteerden we verhoogde expressie van CHGA/chromogranine A en AOC3/VAP-1 in gedifferentieerde humane colonorganoïde en beide eiwitten bevinden zich voornamelijk aan de basolaterale zijde van de organoïde. Verdere studies moeten uitwijzen wat de functionele rol van VAP-1 is in entero-endocriene cellen, welke mogelijk verband houden met hormoonsecretie en/of immuunregulatie.

Darmfibrose is een ernstige complicatie van chronische darmontsteking en er is dringend behoefte aan effectieve therapieën tegen fibrose. Hoofdstuk 5 bestudeerde het effect van pirfenidon, en medicijn wat al wordt toegepast voor de behandeling van longfibrose, op primaire humane darmfibroblasten (p-hIF's). We laten zien dat pirfenidon dosis-afhankelijk de p-hIF-proliferatie remde en de expressie van componenten van het littekenweefsel, zoals COL1A1, COL3A1, COL4A1, COL6A1, FN1 en ELN. TGFβ1, een belangrijk cytokine dat fibrose stimuleert, induceerde collageen-I-expressie in p-hIF, een effectief dat werd tegengegaan door pirfenidon. Het remmende effect van pirfenidon op de proliferatie van p-hIF en de productie van collageen I verdween weer als p-hIF werden gekweekt in de afwezigheid van pirfenidon. De rapamycine (mTOR)-signaleringsroute draagt bij aan orgaanfibrose, maar dit werd nog niet in detail geanalyseerd bij darmfibrose. We tonen aan dat pirfenidon werkt door mTOR en de daarvan afhankelijke p70S6K-route in p-hIF's te deactiveren. We concluderen dat pirfenidon de proliferatie van p-hIF's en de productie van collageen I rechtstreeks onderdrukte via de TGF-β1/mTOR/p70S6K-signaleringsroute. Dit is mogelijk een nieuwe doelwit als medicijn voor de behandeling van darmfibrose.

Kortom, chronische darmaandoeningen, waaronder chronische ontsteking, fibrose en kanker, hebben een grote invloed op het leven van veel patiënten met een toenemende belasting op de gezondheidszorg. Een beter begrip van de onderliggende mechanismen is nodig om effectieve therapeutische methoden te ontwikkelen. Humane darmorganoïden en primaire humane darmfibroblasten zijn beschikbaar en veelbelovende modellen om de fysiologische en pathologische morfologie en werking van darmcellen te onderzoeken bij ziekten die hun oorsprong vinden in het darmepitheel en subepitheliale cellagen. Daarnaast zijn het geschikte modellen om de werking van medicijnen tegen deze aandoeningen te testen.

