

University of Groningen

## New avenues for Epac in inflammation and tissue remodeling in COPD

Oldenburger, Anouk

**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:*  
2014

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

*Citation for published version (APA):*

Oldenburger, A. (2014). *New avenues for Epac in inflammation and tissue remodeling in COPD*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

**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).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**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

Chronisch obstructief longlijden of in het Engels “chronic obstructive pulmonary disease” (COPD) is een medische term waar zowel chronische bronchitis als longemfyseem onder vallen. Beide zorgen voor het bemoeilijken van de ademhaling in COPD patiënten. De belangrijkste oorzaak voor het ontstaan van COPD is roken, maar daarnaast kan luchtverontreiniging ook een belangrijke oorzaak zijn. Op dit moment is COPD de derde doodsoorzaak door ziekte wereldwijd. COPD wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van chronische ontsteking, luchtwegvernaauwing en veranderingen in de longstructuur. De ontsteking kan er voor zorgen dat er verdikking optreedt van de luchtwegwand. Daarnaast wordt er als onderdeel van chronische bronchitis meer slijm aangemaakt, wat voor een verdere vernauwing van de luchtwegen zorgt. Emfyseem wordt gekenmerkt door afbraak van het parenchym, het longweefsel aan het einde van de kleine luchtwegen en de bijhorende longblaasjes. Andere veranderingen in de longstructuur worden veroorzaakt door bindweefselvorming in de luchtwegwand, ook wel luchtwegfibrose genoemd.

De ziekte COPD wordt vastgesteld door het beoordelen van twee parameters van de longfunctie, namelijk de totale hoeveelheid lucht die, na maximale inademing, weer uitgeademd kan worden (FVC; *forced vital capacity*) en de maximale hoeveelheid lucht die in 1 seconde uitgeblazen kan worden (FEV<sub>1</sub>; *forced expiratory volume in 1 second*). De ernst van de ziekte wordt onderverdeeld in 4 stadia – licht, matig ernstig, ernstig en zeer ernstig - via de classificatie van de *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases* (GOLD). Een FEV<sub>1</sub> groter dan 80% duidt op een lichte vorm van COPD en wordt als GOLD I geclassificeerd. Matig ernstige (GOLD II) en ernstige COPD (GOLD III) worden gekenmerkt door een FEV<sub>1</sub> van respectievelijk 50-80% en 30-50%. Een FEV<sub>1</sub> van kleiner dan 30% geeft het GOLD stadium IV aan en duidt op een zeer ernstige vorm van COPD. Recent werden de GOLD criteria verder aangepast, nu met het betrekken van symptomen, luchtweg obstructie en exacerbaties. Deze drie criteria worden onderverdeeld in de GOLD stadia A t/m D. A wordt gekenmerkt door weinig symptomen, een FEV<sub>1</sub> van 50% of hoger en weinig exacerbaties. Patiënten in

stadium B hebben dezelfde kenmerken als patiënten in stadium A maar hebben meer symptomen. Patiënten met weinig symptomen, een FEV<sub>1</sub> lager dan 50% en veel exacerbaties vallen onder stadium C. De aanwezigheid van meer symptomen plaatst de patiënten in stadium D.

De huidige therapie voor COPD bestaat voornamelijk uit het bestrijden van de symptomen, zoals ontsteking en luchtwegvernauwing. Om de huidige therapie te verbeteren is er onderzoek nodig naar de verschillende moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan en de verergering van COPD. Op het moment is hier weinig over bekend. In dit proefschrift ligt de focus op de bijdrage van de signaalroute van cyclisch AMP (cAMP) die betrokken is bij de regulatie van tal van cellulaire processen onder invloed van extracellulaire prikkels. Onder deze signaalroute vallen ook de eiwitten “A-kinase anchoring proteins” (AKAPs), “protein kinase A” (PKA), en “exchange protein directly activated by cAMP” (Epac) waarvan de laatste twee door cAMP geactiveerd worden. In dit proefschrift wordt vooral aandacht gegeven aan Epac en de rol van dit eiwit in de verschillende ziekteprocessen die betrokken zijn bij COPD.

$\beta_2$ -agonisten en fosfodiesterase (PDE) 4-remmers worden op dit moment in de kliniek gebruikt bij de behandeling van COPD en beide verhogen de cAMP concentraties in de cel. Hierbij speelt  $\beta_2$ -agonist-geïnduceerde cAMP productie in luchtweg-gladde spieren een rol bij de verwijding van de luchtwegen, terwijl cAMP gegenereerd door PDE4 remmers in ontstekingscellen een ontstekingsremmende activiteit heeft. Beide soorten medicatie gebruiken echter ieder een ander mechanisme voor het verhogen van cAMP.  $\beta_2$ -agonisten binden aan een G<sub>s</sub> eiwit-gekoppelde  $\beta_2$ -adrenoceptor, welke vervolgens het enzym adenylyl cyclase (AC) kan activeren dat cAMP produceert. Daarentegen voorkomen de PDE4 remmers de afbraak van cAMP in het inactieve 5'-AMP, waardoor de cAMP levels hoog blijven. Naast bovengenoemde effecten kan cAMP ook van belang zijn bij de ontwikkeling en de progressie van verschillende chronische ziektes, doordat cAMP de transcriptie van veel genen en de secretie van eiwitten kan beïnvloeden. In het verleden werd aangenomen dat de effecten van cAMP uitsluitend gemedieerd worden door activatie van PKA. Echter, recente studies hebben aangetoond dat ook Epac geactiveerd kan worden door cAMP. Er bestaan twee eiwitvormen van Epac, Epac1 en Epac2, welke beide tot expressie

komen in verschillende weefsels in de longen en luchtwegen. Verschillende eerdere studies naar de rol van cAMP, in het bijzonder bij longziekten, hebben geresulteerd in fascinerende en onverwachte resultaten. In dit proefschrift worden nieuwe bevindingen beschreven met betrekking tot de rol van de cAMP effector Epac, welke kunnen leiden tot nieuwe aangrijpingspunten voor medicijnen die de huidige COPD therapie kunnen verbeteren.

### **Epac1 en Epac2: rol in ontsteking**

Eén van de belangrijkste kenmerken van COPD is chronische ontsteking, welke wordt gekarakteriseerd door infiltratie en activatie van verschillende ontstekingscellen in de luchtwegen en het longparenchym, zoals macrofagen, monocytten, lymfocytten en neutrofielen. Bij COPD is een belangrijke rol voor neutrofielen weggelegd. Activatie van deze ontstekingscellen leidt tot de uitscheiding van cytokines. Cytokines zijn moleculen die een belangrijke rol spelen bij de start en progressie van een ontstekingsreactie. Interleukine-8 (IL-8) is een voorbeeld van een cytokine dat in staat is om ontstekingscellen te activeren en is tevens verhoogd bij COPD patiënten. Bij COPD patiënten correleert het aantal neutrofielen in de long met de IL-8 concentratie, wat het belang van IL-8 en neutrofielen bij COPD onderstreept. Het effect van sigarettenrook, de belangrijkste oorzaak voor het ontstaan van COPD, op de secretie van IL-8 is aangetoond bij verschillende celtypes, zoals bronchiale epitheelcellen, macrofagen, fibroblasten en luchtweg-gladde spiercellen. Eerdere experimenten uitgevoerd in onze groep hebben aangetoond dat Epac en PKA de uitscheiding van IL-8 door luchtweg-gladde spiercellen geïnduceerd door de ontstekingsmediator bradykinine bevorderen en dat beide cAMP effectoren hierbij samenwerken. De uitscheiding van IL-8 kan verlopen via Rap1, een eiwit dat door Epac geactiveerd wordt, of via de *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1/2). Echter, de rol van Epac en PKA in de IL-8 uitscheiding door sigarettenrook is nog niet bestudeerd. In **hoofdstuk 3** laten we zien dat de  $\beta_2$ -agonist fenoterol en specifieke activatie van Epac of van PKA de uitscheiding van IL-8 door luchtweg-gladde spiercellen onder invloed van sigarettenrookextract remmen. Als specifieke Epac activator maakten we gebruik van het cAMP analogon 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, terwijl 6-Bnz-cAMP werd gebruikt als specifieke PKA activator. Dat het ontstekingsremmende effect van 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP inderdaad veroorzaakt werd door activatie van Epac

werd aangetoond doordat dit effect verlaagd was na het verminderen van hoeveelheid Epac1 en Epac2 in de luchtweg-gladde spiercellen met behulp van specifieke moleculair biologische technieken. Vervolgexperimenten toonden aan dat Epac de IL-8 uitscheiding geïnduceerd door sigarettenrookextract vermindert via remming van de transcriptiefactor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), terwijl PKA de activatie van ERK1/2 remt. Zowel NF- $\kappa$ B als ERK1/2 induceren genexpressie na stimulatie met sigarettenrookextract. Daarnaast hebben we aangetoond dat sigarettenrookextract de hoeveelheid Epac1 eiwit in luchtweg-gladde spiercellen verlaagt, terwijl de hoeveelheid Epac2 en PKA onveranderd is. Van belang is de waarneming dat de hoeveelheid Epac1 ook lager is in longweefsel afkomstig van patiënten met COPD (**hoofdstuk 3**). Deze verlaging van Epac1 in COPD patiënten zou veroorzaakt kunnen worden door onomkeerbare veranderingen in de eiwitstructuur van Epac1 door oxidatieve stress, een gevolg van blootstelling aan sigarettenrook. Bij oxidatieve stress is er een verhoging van reactieve zuurstofverbindingen welke naast veranderingen in de eiwitstructuur ook andere longschade en chronische ontsteking kunnen veroorzaken. Andere onderzoekers hebben laten zien dat ook het pro-fibrotische cytokine transforming growth factor (TGF)- $\beta_1$ , dat verhoogd is bij COPD patiënten, de hoeveelheid Epac1 kan verlagen. Hoewel wij hebben laten zien dat de  $\beta_2$ -agonist fenoterol de ontsteking kan remmen in luchtweg-gladde spiercellen, hebben klinische studies slechts een klein positief effect laten zien op het remmen van ontstekingen in de luchtwegen door  $\beta_2$ -agonisten. Zulke verschillen tussen celexperimenten en klinische studies kunnen onder andere veroorzaakt worden door verschillen in de hoeveelheid  $\beta_2$ -adrenergic receptoren aanwezig op verschillende ontstekingsbevorderende cellen en door een verschillende gevoeligheid van verschillende cellen voor desensitisatie van  $\beta_2$ -adrenerge receptoren door de  $\beta_2$ -agonist. Desensitisatie is een biochemisch proces waarbij de receptor bij stimulatie ongevoelig wordt voor de agonist en over het algemeen zijn specifieke ontstekingscellen, zoals macrofagen en neutrofielen, hier gevoeliger voor dan structurele cellen, zoals gladde spiercellen. Als een potentiële effector in cAMP gestuurde signaalroutes en als een nieuw ontdekte remmer van de door NF- $\kappa$ B gestuurde ontstekingsroute, kan de waargenomen verlaging van Epac1 door sigarettenrook een extra verklaring zijn voor de geringe effecten van  $\beta_2$ -agonisten op de ontsteking bij COPD.

Om de oorzaak van de Epac1 verlaging te achterhalen hebben we gekeken naar de mogelijke betrokkenheid van microRNAs (miRNAs). MicroRNAs zijn zogenaamde epigenetische regulatoren wat betekent dat ze veranderingen in de genfunctie kunnen veroorzaken zonder de DNA volgorde te veranderen. Vanuit het DNA wordt via het transcriptieproces mRNA gemaakt, hetgeen vervolgens tijdens het translatieproces resulteert in de synthese van eiwitten. miRNAs zijn o.a. betrokken bij het precies afstellen van activiteiten in de cel door het remmen van de DNA-transcriptie, het afbreken van mRNA en het remmen van het translatieproces. In deze hoedanigheid zijn miRNAs betrokken bij de regulatie van diverse processen in het lichaam, waaronder ontstekingsreacties. Recente studies hebben aangetoond dat miRNAs ook betrokken kunnen zijn bij ontstekingsreacties in COPD. Een van de miRNAs die verhoogd is in serum van COPD patiënten is miRNA-7. Computeranalyse heeft uitgewezen dat Epac1 een mogelijk doelwit is van miRNA-7. In **hoofdstuk 4** hebben we de interactie tussen Epac1 en miRNA-7 bestudeerd. Sigarettenrookextract verhoogde de hoeveelheid miRNA-7 specifiek in luchtweg-gladde spiercellen. In het verlengde hiervan zagen we ook een verhoging van miRNA-7 in bronchiaal glad-spierweefsel van COPD patiënten, geïsoleerd met behulp van laser micro-dissectie. De relatie tussen miRNA-7 en Epac1 expressie werd aangetoond doordat de hoeveelheid Epac1 verlaagd was in luchtweg-gladde spiercellen waarin we met behulp van specifieke moleculair biologische technieken meer miRNA-7 tot expressie gebracht hadden. Onze gegevens suggereren dat de verlaging van Epac1 in COPD patiënten (zoals beschreven in hoofdstuk 3) wordt veroorzaakt door een verhoging van miRNA-7 door sigarettenrook (**hoofdstuk 4**). Deze interactie tussen miRNA-7 en Epac1 speelt wellicht een rol in Epac gereguleerde ontstekingsreacties.

Gebaseerd op de resultaten in **hoofdstuk 3** lijken zowel Epac1 als Epac2 betrokken te zijn bij de verlaging van IL-8 secretie geïnduceerd door sigarettenrookextract in luchtweg-gladde spiercellen. Immers, vermindering van de hoeveelheid van zowel Epac1 als Epac2 gaf een vermindering van het ontstekingsremmende effect van de specifieke Epac activator 8-pCPT-2-O-Me-cAMP. Echter, het door Rap en het door Epac geactiveerde fosfolipase C $\epsilon$  (PLC $\epsilon$ ) lijkt een rol te spelen bij de productie van keratinocyte-derived chemokine (KC), het muisequivalent van IL-8, IL-1 $\beta$  en tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , welke allen betrokken zijn bij het ontstaan van ontsteking. De door PLC $\epsilon$  geïnduceerde verhoging van KC ging gepaard met een verhoging van

de hoeveelheid neutrofielen, wat tevens een kenmerk is van COPD. Daarnaast is het bekend dat PLC $\epsilon$  ook hoog tot expressie wordt gebracht in de muizenlong. De bevindingen in celexperimenten laten dus zien dat Epac1, Epac2 en PLC $\epsilon$  differentieel betrokken zijn bij de regulatie van ontstekingsprocessen. De rol van Epac1, Epac2 en PLC $\epsilon$  in luchtwegontsteking en remodeling werd vervolgens onderzocht in een diermodel voor COPD. Om onderscheid te kunnen maken tussen de effecten van Epac1, Epac2 en PLC $\epsilon$  werden muizen bestudeerd, waarbij respectievelijk Epac1, Epac2 en PLC $\epsilon$  werden uitgeschakeld door middel van specifieke moleculair biologische technieken. Deze zogenaamde knockout muizen werden op vier opeenvolgende dagen blootgesteld aan sigarettenrook, hetgeen ontstekingsreacties en veranderingen in het longweefsel veroorzaakt (**hoofdstuk 7**). Aangetoond werd dat, in vergelijking met normale wild type (WT) muizen, de hoeveelheid ontstekingscellen, zoals macrofagen en neutrofielen, en de secretie van het cytokine IL-6 verlaagd is in Epac2 knockout muizen na blootstelling aan sigarettenrook. Ook bij de PLC $\epsilon$  knockout muizen was er een verlaging te zien in IL-6 secretie en de aanwezigheid van neutrofielen in vergelijking met WT muizen na blootstelling aan sigarettenrook, terwijl Epac1 knockout muizen een verlaging van de macrofagen liet zien. Het aantal lymfocyten, die normaal slechts in kleine hoeveelheden aanwezig zijn in de longen van WT muizen, is daarentegen verhoogd in Epac1 knockout muizen in vergelijking met WT muizen, zowel onder normale omstandigheden als na expositie aan sigarettenrook (**hoofdstuk 7**). Aangezien de afwezigheid van met name Epac2 een remmend effect heeft op de door sigarettenrook geïnduceerde ontsteking, tonen onze resultaten aan dat Epac2 deze ontsteking bevordert. De rol van Epac1 in luchtwegontsteking lijkt tweeledig, hetgeen in overeenstemming is met andere onderzoeken die aantonen dat het effect van Epac1 op ontstekingsprocessen celspecifiek is. De bijdragen van Epac1 en Epac2 aan de ontstekingsprocessen in de luchtwegen zouden tevens bestudeerd kunnen worden door toediening van recent ontwikkelde farmaca die Epac1 of Epac2 remmen in WT muizen. Echter, er dient nog meer onderzoek gedaan te worden naar de effectiviteit, specificiteit en selectiviteit van deze remmers. Naast de relatief korte expositie aan sigarettenrook in onze experimenten, zal langduriger blootstelling, zoals bij COPD, meer inzicht geven in de rol van Epac bij chronische luchtwegontsteking.

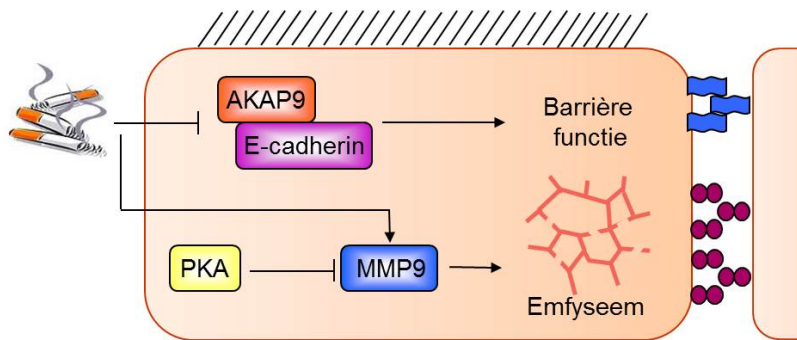
Schade aan de epitheliale barrière geïnduceerd door sigarettenrook en een verslechterde herstelfunctie van het luchtwegepitheel zijn ook pathofysiologische kenmerken van COPD. Onder normale omstandigheden zorgt de epitheliale barrière ervoor dat schadelijke stoffen moeilijker de longen binnen komen. Door sigarettenrook kan deze barrière verstoord raken, hetgeen optreedt in COPD patiënten. Ontsteking geïnduceerd door sigarettenrook in combinatie met zuurstofradicalen verslechtert de epitheliale barrièrefunctie en vertraagt het herstel hiervan. Met betrekking tot de instandhouding van de epitheliale barrièrefunctie was onze hypothese dat het A-kinase anchoring proteïn (AKAP) familielid AKAP9 een belangrijke rol speelt. Eerdere studies hebben aangetoond dat AKAP9 de mogelijkheid heeft om – in samenwerking met Epac1 - de endotheliale barrière functie te versterken. Leden van de AKAP eiwitfamilie zorgen voor compartimentalisatie van de cAMP-signaalroute in de cel door specifieke complexvorming met eiwitten die cAMP produceren of afbreken en eiwitten die geactiveerd worden door cAMP en daarmee een specifieke celfunctie reguleren. AKAPs vormen derhalve complexen met (combinaties van) onder meer de  $\beta_2$ -adrenerge receptor, fosfodiësterases zoals PDE4, PKA, Epac en doelwiteiwitten die uiteindelijk een cellulaire respons geven. In **hoofdstuk 6** laten we zien dat sigarettenrookextract de barrièrefunctie van humane bronchiale epitheelcellen verlaagt en dat de expressie van zowel E-cadherine, dat belangrijk is voor het in stand houden van cel-cel-contacten betrokken bij de barrièrefunctie, als AKAP9 is verlaagd in de celmembraan. Tevens hebben we aangetoond dat AKAP9 en E-cadherine een complex vormen in de celmembraan. Sigarettenrookextract veranderde niet de expressie van AKAP5 en AKAP12, welke beide een interactie kunnen aangaan met de  $\beta_2$ -adrenerge receptor. Deze data laten een specifieke rol voor AKAP9 zien in sigarettenrookextract-geïnduceerde effecten op de epitheliale barrière zoals beschreven in dit proefschrift. Het uitschakelen van AKAP9 verlaagde de epitheliale barrière functie en voorkwam dat st-HT31, een remmer van de AKAP-PKA interactie, de lokalisatie van E-cadherine bij de membraan kon herstellen. Een verminderde expressie van AKAP9 mRNA werd waargenomen in bronchiale epitheelcellen afkomstig van rokende individuen en in longweefsel van COPD patiënten (**hoofdstuk 6**). Onze data laten zien dat AKAP eiwitten en dan voornamelijk AKAP9 de bronchiale epitheliale barrièrefunctie onderhouden via complex vorming met E-cadherine bij de



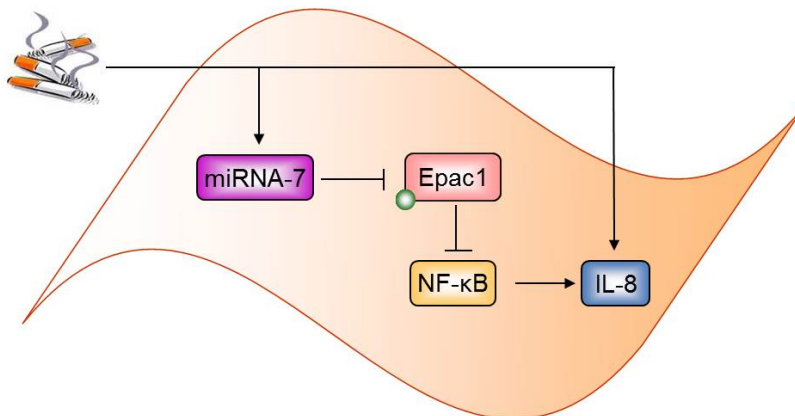
plasmamembraan. PKA is ook betrokken bij dit complex omdat vermindering van de interactie tussen PKA en AKAP de epitheliale barrière kan herstellen. Veranderingen in de expressie of interactie van deze eiwitten kunnen wellicht belangrijk zijn in de pathofysiologie van COPD (**hoofdstuk 6**). In **hoofdstuk 7** hebben we laten zien dat de mRNA expressie van het regulerende deel van PKA (PKA-RI) verminderd was in de Epac2 knockout muizen. Omdat een bepaalde groep AKAP eiwitten een interactie kan aangaan met PKA-RI is het aannemelijk dat de reductie in PKA-RI kan leiden tot veranderingen in de AKAP complexen waarbij PKA-RI betrokken is. Dit zou kunnen resulteren in veranderde biologische functies en verstoorde fysiologie. Deze veranderingen in de verdeling van cAMP spelen mogelijk een rol in ontstekingsreacties en weefselveranderingen bij COPD.

Samenvattend laat dit proefschrift zien dat zowel Epac1 als Epac2 betrokken zijn bij ontstekingsreacties geïnduceerd door sigarettenrook, hoewel er een duidelijk verschil te zien is in de bijdragen van Epac1 en Epac2 (Figuur 1 en 2). Epac1 remt de ontsteking in zowel luchtweg-gladde spiercellen blootgesteld aan sigarettenrookextract als in bronchiale gladde spier van COPD patiënten. Dit is in tegenstelling tot onze studies in de Epac2 knockout muis welke laten zien dat Epac2 vooral de ontstekingsreactie bevordert. Deze rol voor Epac2 lijkt tegengesteld te zijn aan de remmende werking van cAMP verhogende medicijnen zoals PDE4 remmers, op de ontstekingsreactie. Echter kan ook de balans tussen de verschillende cAMP geactiveerde eiwitten een rol spelen bij de uitkomst van cAMP verhogende medicijnen.

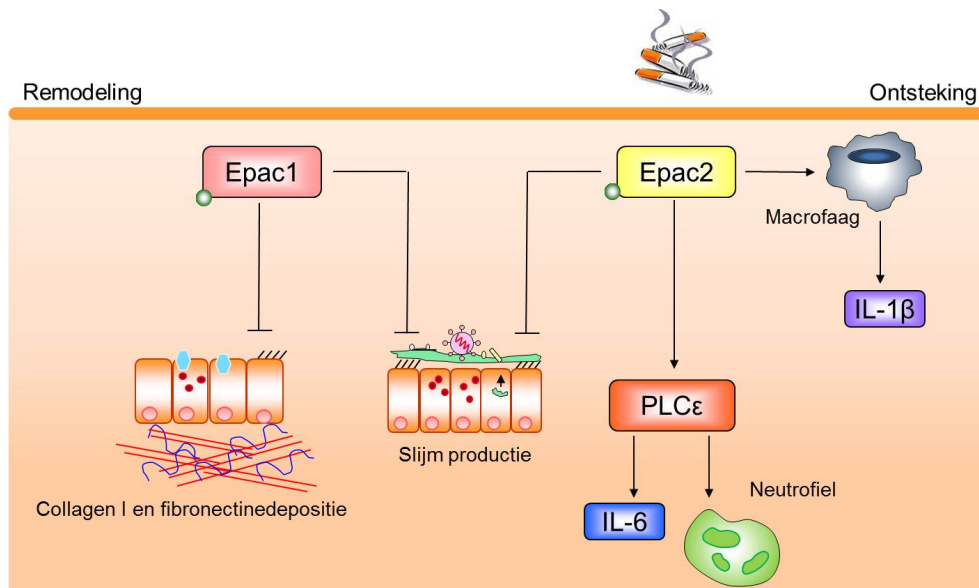
## Bronchiale epitheelcellen



## Luchtweg-gladde spiercellen



**Figuur 1:** Regulerende rol van Epac1 en PKA in structurele luchtwegcellen. De figuur toont de belangrijkste resultaten van onze *in vitro* studies. In humane bronchiale epitheelcellen, remt sigarettenrookextract zowel de expressie van AKAP9 als van E-cadherine. Dit zorgt voor een verstoring van de epitheliale barrièrefunctie. Daarnaast remt PKA de door sigarettenrookextract geïnduceerde (pro-) MMP9 expressie en activatie; de modulatie van pro-MMP9 door PKA leidt mogelijk tot een afname van de ontwikkeling van emfyseem. In luchtweg-gladde spiercellen verhoogt sigarettenrookextract miRNA-7, dat vervolgens de expressie van Epac1 remt. Anderzijds remt Epac1 NF-κB en de door sigarettenrookextract geïnduceerde IL-8 secretie.



**Figuur 2:** Rol van Epac1 en Epac2 in ontsteking en remodeling in een muismodel voor COPD. De figuur toont de belangrijkste resultaten van onze *in vivo* studies. In dit model waarin muizen korte tijd worden blootgesteld aan sigarettenrook, remt Epac1 de depositie van collageen I en fibronectine in longweefsel. Tegelijkertijd remmen zowel Epac1 als Epac2 de slijmproductie in muizen. Epac2 speelt een rol bij de door sigarettenrook geïnduceerde verhoging van macrofagen en IL-1 $\beta$  secretie. Epac2 zorgt, mogelijk via PLC $\epsilon$ , ook voor een verhoging van neutrofielen en IL-6 secretie.

Het is belangrijk om te benadrukken dat hoewel  $\beta_2$ -agonisten en PDE4 remmers allebei cAMP verhogen ze allebei verschillende mechanismen gebruiken wat kan leiden tot een verschillend effect op cellulaire functies. Het is bekend dat  $\beta_2$ -agonisten efficiënt de luchtwegobstructie verminderen via het induceren van bronchusverwijding. Daarnaast kunnen  $\beta_2$ -agonisten de secretie van cytokines in cel experimenten remmen. Echter is de remmende werking van  $\beta_2$ -agonisten op de ontsteking in mens en andere species niet aanwezig. Aan de andere kant, PDE4 remmers zoals rolipram remmen slechts marginaal de luchtwegobstructie, maar reduceren de luchtwegontsteking en daarmee mogelijk de exacerbatie frequentie in COPD patiënten. Compartmentalisatie van cAMP in de cel door AKAP eiwitten is mogelijk verantwoordelijk voor de verschillende biologische responsen geïnduceerd door de verschillende cAMP verhogende farmaca. In dit proefschrift

hebben we de aanwezigheid van op AKAP9 gebaseerde eiwit complexen laten zien en hun betrokkenheid bij de bronchiale epitheliale barrière functie. Aangezien AKAPs ook complexen kunnen vormen met Epac1 en Epac2, zijn verdere studies noodzakelijk om te bepalen in welke mate AKAPs betrokken zijn bij de remmende of bevorderde eigenschappen van Epac1 en Epac2 op de ontsteking. De data weergegeven in dit proefschrift laten zien dat Epac1 en Epac2 mogelijk verschillende rollen hebben met betrekking tot ontsteking geïnduceerd door sigarettenrook. De focus van verder onderzoek zou gericht moeten zijn op de ontwikkeling van stoffen die specifiek Epac1 activeren of Epac2 remmen om de chronische ontsteking in COPD te verminderen. Het identificeren van de interacties tussen Epacs en AKAPs als mogelijke oorzaak voor de verschillen tussen Epac1 en Epac2 zou in de toekomst meer aandacht moeten krijgen om eventueel de huidige therapie te kunnen verbeteren.

### **Remodeling: Epac1 en Epac2**

Veranderingen in de weefselstructuur (remodeling) van de luchtwegen en longweefsel is een andere kenmerk van COPD en omvat verschillende eigenschappen, zoals een toename van slijmproducerende cellen en daarmee gepaard gaande excessieve slijmproductie, luchtwegwandfibrose en emfyseem. Sigarettenrook verhoogt de slijmproductie, de afzetting van extracellulaire matrixeiwitten in de luchtwegen en induceert emfyseem. De meerderheid van de extracellulaire matrixeiwitten, zoals collageen en fibronectine, worden geproduceerd door fibroblasten, maar kunnen ook geproduceerd worden door andere structurele cellen zoals luchtweg-gladde spiercellen en epitheelcellen. Verstoringen in de strikt gecontroleerde balans tussen productie en afbraak van extracellulaire matrixeiwitten kunnen enerzijds leiden tot fibrose van de (kleine) luchtwegen door excessieve productie en afzetting van extracellulaire matrixeiwitten, en anderzijds tot emfyseem door excessieve afbraak van extracellulaire matrixeiwitten in het parenchym (longblaasjes). Matrix metalloproteases (MMPs) en lichaamseigen remmers van metalloproteinasen (TIMPs, *tissue inhibitors of metalloproteinases*) reguleren de balans tussen productie en afbraak van extracellulaire matrixeiwitten. In COPD patiënten zijn zowel MMP9 als TIMP1, de belangrijkste remmer van MMP9, verhoogd. Dit maakt het lastig om de uiteindelijke uitkomst met betrekking tot extracellulaire

matrixproductie of -afbraak te voorspellen en weefsel-afhankelijke verschillen in MMP9/TIMP1 expressie zouden een verklaring kunnen geven voor het optreden van zowel fibrose als emfyseem in COPD patiënten. Interessant is dat studies hebben aangetoond dat medicijnen die cAMP verhogen de productie van collageen I in humane longfibroblasten verlagen. Daarnaast remmen zowel PKA als Epac de productie van collageen I en III in fibroblasten. Binding van Epac1 aan de geactiveerde TGF- $\beta$ 1 type I receptor, welke de productie van extracellulaire matrixeiwitten verhoogt, zorgt voor verminderde fosforylatie van de transcriptiefactor Smad2 en de Smad2-afhankelijke genexpressie. Dit suggereert dat Epac1 de door TGF- $\beta$ 1-geïnduceerde collageen productie kan remmen. Ook is aangetoond dat remming van PDE4 alsmede behandeling met adenosine of de cAMP analogo 8-Br-cAMP de genexpressie van MMP9 en TIMP1 vermindert in verschillende celtypen. Hoewel een rol voor de cAMP signaalroute in de regulatie van weefselveranderingen is vastgelegd, is de exacte rol van de cAMP effectoren Epac en PKA nog grotendeels onbekend. In **hoofdstuk 5** laten we zien dat blootstelling van humane bronchiale epitheelcellen aan sigarettenrookextract leidt tot een verhoging van MMP9 mRNA en van de MMP9/TIMP1 ratio. Deze inductie van MMP9 mRNA wordt gereduceerd door PKA activatie. Pro-MMP9 levels geïnduceerd door sigarettenrookextract worden gereduceerd door de  $\beta_2$ -agonist fenoterol en door specifieke activatie van PKA (**hoofdstuk 5**). Dit suggereert dat remming van PKA in de luchtwegen de MMP9/TIMP1 ratio kan normaliseren en vervolgens de ontwikkeling van fibrose kan remmen. Daarentegen, activatie van PKA kan mogelijk emfyseem remmen door de MMP9/TIMP1 ratio te verlagen.

Hoewel Epac niet betrokken lijkt te zijn bij de regulatie van MMP (**hoofdstuk 5**), hebben we wel de rol van Epac1 en Epac2 bestudeerd in remodelingprocessen in de long door Epac1 knockout en Epac2 knockout muizen bloot te stellen aan sigarettenrook. In **hoofdstuk 7** laten we zien dat Epac1 knockout muizen meer van het pro-fibrotische cytokine TGF- $\beta$ 1 (mRNA) en de extracellulaire matrixeiwitten collageen I (mRNA en eiwit) en fibronectine (mRNA en eiwit) tot expressie brengen. De expressie van deze eiwitten was niet veranderd in Epac2 knockout muizen. Aan de hand van de resultaten beschreven in dit proefschrift postuleren wij dat specifiek Epac1 anti-fibrotisch werkt door de productie van TGF- $\beta$ 1 en extracellulaire matrixeiwitten te verlagen (**hoofdstuk 7**). Excessieve slijmproductie

is eveneens het gevolg van remodeling in de luchtwegen. Interessant is dat we in Epac1 knockout en Epac2 knockout muizen op basaal niveau een hogere mRNA expressie van het slijmeiwit MUC5AC waarnemen. Hoewel het aantal gobletcellen, die verantwoordelijk zijn voor slijmproductie, is verhoogd in PLC $\epsilon$  knockout muizen, laten de Epac1 knockout muizen een trend naar een verhoogde expressie van SPDEF zien, een eiwit dat de differentiatie van goblet cellen stimuleert (**hoofdstuk 7**). Hoewel alleen Epac1 de fibrotische processen remt, lijken zowel Epac1 als Epac2 een remmend effect te hebben op de slijmproductie. Gebaseerd op de resultaten beschreven in dit proefschrift stellen we dat Epac1 en Epac2 verschillende rollen hebben met betrekking tot remodellingsprocessen in de long en dat deze rollen ook nog celtype-afhankelijk zijn.

### **Klinische implicaties en toekomst perspectieven**

De GLUCOLD studie (Groningen Leiden Universities study of Corticosteroids in Obstructive Lung Disease) was een 30 maanden gerandomiseerde, placebo-gecontroleerde klinische studie, waarin het effect van de corticosteroid fluticason en de  $\beta_2$ -agonist salmeterol is getest op de ontsteking van de luchtwegen en de progressieve achteruitgang van de FEV<sub>1</sub> in COPD patiënten. Uit deze studie bleek dat salmeterol de ontstekingsremmende eigenschappen van fluticason niet versterkte, maar dat de combinatie van fluticason en salmeterol de FEV<sub>1</sub> verbeterde zonder veranderingen in de achteruitgang van de FEV<sub>1</sub>. Twee placebo-gecontroleerde, dubbelblinde klinische studies uitgevoerd in verschillende centra hebben laten zien dat de PDE4 remmer roflumilast de FEV<sub>1</sub> verhoogt en de frequentie van exacerbaties verlaagt. Vergelijkbaar met corticosteroiden zijn de gunstige effecten van roflumilast echter beperkt tot de COPD patiënten die een verhoogde kans hebben op exacerbaties. Dit geeft aan dat er verbetering is noodzakelijk is van de huidige therapie voor COPD. In humane longfibroblasten remt een combinatie van de  $\beta_2$ -agonist indacaterol met de PDE4 remmer roflumilast de secretie van verschillende eiwitten die ontsteking bevorderen en van eiwitten die fibrose veroorzaken, zoals fibronectine. Met betrekking tot excessieve slijm productie is het bekend dat de  $\beta_2$ -agonist salmeterol het slijmtransport bevordert, mogelijk via een verhoogde aanwezigheid van epitheelcellen met trilhaartjes of door een verbetering van de slagfrequentie van de trilhaartjes.

Deze data impliceren een rol voor de cAMP signaalroute in de behandeling van COPD. Het combineren van verschillende geneesmiddelen kan leiden tot een betere behandeling van COPD patiënten.

In dit proefschrift lag de focus op eiwitten die door cAMP geactiveerd worden, voornamelijk Epac, en we hebben laten zien dat Epac 1 en Epac2 verschillende rollen hebben in het reguleren van ontstekings- en remodelingsprocessen in experimentele modellen van COPD. We tonen aan dat activatie van Epac de door sigarettenrook geïnduceerde ontsteking specifiek kan remmen in luchtweg gladde spiercellen door remming van NF- $\kappa$ B (**hoofdstuk 3**). In een acuut model van COPD waarin we muizen met een verschillende genetische achtergrond hebben blootgesteld aan sigarettenrook hebben we laten zien dat Epac2 de ontsteking juist kan bevorderen. Daarentegen remt Epac1 specifiek een aantal remodellingsparameters, zoals TGF- $\beta$ 1, collageen I en fibronectine, terwijl zowel Epac1 als Epac2 de MUC5AC mRNA expressie remmen (**hoofdstuk 7**). Gebaseerd op deze nieuwe bevindingen zou de ontwikkeling van stoffen die selectief Epac1 activeren of Epac2 remmen van additieve waarde zijn bij het verlichten van de symptomen en mogelijk ook structurele afwijkingen bij COPD zoals luchtweg obstructie en remodeling kunnen reduceren. Omdat Epac1 en Epac2 verschillende effecten kunnen hebben in bepaalde weefsels en cellen zijn er medicijnen nodig die enkel werkzaam zijn waar de specifieke remming van Epac1 of de specifieke activatie van Epac2 nodig is.

De impact van compartementalisatie van cAMP productie/afbraak met specifieke effectoren door specifieke AKAPs op de (patho)fysiologie en farmacologie van de luchtwegen vereist meer studie. In **hoofdstuk 6** laten we zien dat AKAP9 betrokken is bij de regulatie van de epitheliale barrièrefunctie middels een interactie met E-cadherine. In de toekomst moet het onderzoek gericht zijn op het vinden van een potentiële interactie tussen AKAP eiwitten en Epac1 of Epac2 en de impact hiervan op de ontwikkeling en behandeling van COPD. Dit onderzoek zou zich niet alleen moeten richten op de epitheliale barrièrefunctie, maar ook op ontsteking, emfyseem en fibrose van de kleine luchtwegen.

## **Belangrijkste conclusies**

Uit het onderzoek gepresenteerd in dit proefschrift kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- Epac en PKA remmen de door sigarettenrookextract geïnduceerde IL-8 secretie van luchtweg-gladde spiercellen via remming van respectievelijk NF- $\kappa$ B en ERK1/2 (**hoofdstuk 3**).
- De eiwitexpressie van Epac1, maar niet Epac2, is verlaagd in longweefsel van COPD patiënten; dit proces wordt waarschijnlijk veroorzaakt door sigarettenrook (**hoofdstuk 3**).
- Sigarettenrookextract verhoogt de expressie van miRNA-7 in luchtweg-gladde spiercellen. Aangezien overexpressie van miRNA-7 de expressie van Epac1 in luchtweg-gladde spiercellen verlaagt, zou de verlaging van Epac1 door sigarettenrookextract in deze cellen verklaard kunnen worden door een interactie tussen Epac1 en miRNA-7 (**hoofdstuk 4**).
- Sigarettenrookextract induceert MMP mRNA expressie en activiteit in humane bronchiale epitheelcellen, welke beide worden geremd door activatie van PKA, maar niet door activatie van Epac (**hoofdstuk 5**).
- In humane bronchiale epitheelcellen wordt de epitheliale barrièrefunctie verminderd door sigarettenrookextract door het specifiek verminderen van E-cadherine expressie in de celmembraan (**hoofdstuk 6**).
- De barrièrefunctie in humane bronchiale epitheelcellen wordt gereguleerd door AKAP9 middels een directe interactie met E-cadherine (**hoofdstuk 6**).
- In muizen speelt Epac1 een remmende rol op door sigarettenrookextract geïnduceerde remodelingsprocessen in de longen (**hoofdstuk 7**).
- In muizen bevordert Epac2, vermoedelijk via PLC $\epsilon$ , de door sigarettenrookextract geïnduceerde luchtwegontsteking (**hoofdstuk 7**).



