

University of Groningen

## Effects of lifestyle and environmental factors on intestinal epithelial cell morphogenesis

Klunder, Leo Jan

**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:*

2016

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

*Citation for published version (APA):*

Klunder, L. J. (2016). *Effects of lifestyle and environmental factors on intestinal epithelial cell morphogenesis*. Rijksuniversiteit Groningen.

### 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

Darmepitheel, de binnenste laag van de darm, is in staat voedingsstoffen en vocht op te nemen, terwijl het een verder ondoordringbare laag vormt. Om hiertoe in staat te zijn, wordt de intestinale epitheliale morfogenese strak gereguleerd hetgeen leidt tot een onderling verbonden, gepolariseerde monolaag van darmepitheelcellen. Polariteit is de capaciteit van epitheel om zich ten opzichte van de buitenwereld in de ruimte te ordenen. Hierbij creëert een epitheelcel in functie en eiwitcompositie verschillende membraandomeinen, die elk met een ander compartiment in verbinding staan. Het apicale domein staat in verbinding met het lumen van de darm, terwijl het basolaterale domein in verbinding staat met de omliggende cellen en het onderliggende weefsel. Deze domeinen worden gescheiden door zogeheten tight junctions, die zorg dragen voor het impermeabel zijn van de interepitheliale ruimte en voorkomen dat de membraandomeinen in elkaar kunnen overvloeien. Epitheliale polariteit is essentieel voor homeostase en immuniteit in de darm, zoals in detail wordt uitgewerkt in **hoofdstuk 2**. Onder invloed van intrinsieke en extrinsieke factoren kan de morfogenese en daardoor de functie van het epitheel verstoord worden. Diermodellen en klinische studies kunnen kennis bieden over ziektefenotypen in de context van het complexe samenspel van vele verschillende celtypen. In dit proefschrift presenteerden wij een driedimensionaal celkweekstelsel, die een met de in vivo situatie overeenkomende gepolariseerde organisatie van het darmepitheel laat zien. Dit model dient als een reductionistische aanpak voor het meten van de directe effecten van individuele extrinsieke en intrinsieke factoren op de morfogenese en integriteit van darmepitheel.

In **hoofdstuk 3** hebben we laten zien dat darmepitheelcellen in staat zijn tot het vormen van sferoïde monolaag rond een lumen, gelijkend op de in vivo organisatie van darmepitheel. In zulke sferoïden, vertonen de darmepitheelcellen een in vivo-achtige gepolariseerde verdeling van celcomponenten. Zij laten duidelijk te onderscheiden apicale en basolaterale membraandomeinen zien, met in het lumen stekende microvilli en basaal aangeworven laminine, onderdeel van de basaalmembraan. De tight junctions zijn juist gelokaliseerd en functioneel, zoals blijkt uit de impermeabiliteit van de sferoïden. We hebben laten zien dat deze sferoïden hun impermeabiliteit verliezen op een apoptose-afhankelijke wijze wanneer zij worden blootgesteld aan de pro-inflammatoire cytokine TNF. Daarnaast leidt blootstelling aan TNF vanaf het begin van de 3d-kweek tot een vertraagde vorming van een apicobasale as, en worden lumens alleen secundair gevormd, nadat de binnenste cellen van een cluster apoptotisch zijn geworden, een proces dat cavitatie wordt genoemd en fysiologisch plaatsvindt bij de vorming van melkklierweefsel. Dit toont aan dat TNF niet alleen een apoptose afhankelijk storende effect heeft op de darmepitheelbarrièrefunctie, maar ook een storende invloed op de darmepitheliale morfogenese.

In **hoofdstuk 4** onderzochten we de rol van het energiemetabolisme in de morfogenese in ons model. We hebben aangetoond dat beide belangrijkste metabole routes; glycolyse en oxidatieve fosforylering, bijdragen aan efficiënte proliferatie, en sferoïdgrootte. Geen van beide metabole routes is echter op zichzelf noodzakelijk voor een efficiënte polarisatie. Wij lieten zien dat, contrasterend met het effect van TNF, het tevens pro-inflammatoire cytokine IFN $\gamma$  celproliferatie significant induceerde in dit modelsysteem, resulterend in grotere sferoïden. Deze inductie is afhankelijk van glycolyse, maar niet van oxidatieve fosforylering. De studies beschreven in hoofdstukken 3 en 4 laten zien dat verschillende pro-inflammatoire cytokines, resp. TNF en IFN $\gamma$ , de morfogenese van darmepitheel in dit

model zeer verschillend beïnvloeden.

In **hoofdstuk 5** gebruikten we ons model om de gevolgen van roken, als bekende risicofactor voor IBD, op epitheliale functie en morfogenese te beoordelen. Bij blootstelling aan sigarettenrookextract toonden de sferoïden een verminderde proliferatie en verminderde polarisatie, met een gestoorde epitheliale morfogenese tot gevolg. Deze effecten waren overdraagbaar op dochtercellen. Interessant is dat sigarettenrookextract de barrièrefunctie en morfogenese van al gevormde sferoïden niet verstoort, wat erop wijst dat de effecten van sigarettenrook in het bijzonder relevant zijn ten tijde van actieve morfogenese, zoals bijvoorbeeld gedurende een wondgenezingsrespons. Ten slotte, laten we zien dat de toediening van N-acetyl-L-cysteïne (NAC) de remmende effecten van sigarettenrookextract volledig neutraliseerde, op glutathion afhankelijke en onafhankelijke wijze. Deze studie toont aan dat sigarettenrookcomponenten en direct effect op darmepitheelcellen kunnen bewerkstelligen, en dat NAC gebruikt zou kunnen worden voor het neutraliseren van rook-gemedieerde darmepitheeldefecten.

In **hoofdstuk 6** onderzochten we de invloed van de apicale recycling endosoom regulator myosinVb op darmepitheliale barrièrefunctie. MyosinVb is het eiwit waarvoor het gen MYO5b codeert, een gen waarvan een mutatie geassocieerd is met microvillus inclusion disease (MIVD), een ernstige congenitale secretore diarree. We tonen aan dat het verlies van myosine Vb functioneel is voor een herverdeling van tight junction-eiwit Claudin-1 in MVID enterocyten. Myosine Vb blijkt het transport van Claudin-1 naar de tight junctions te regelen, maar niet de correcte lokalisatie van andere tight junction-eiwitten. De tight junctions waren functioneel, aangezien permeabiliteit onveranderd bleek zonder myosin5b en daardoor zonder correct gelokaliseerd claudine-1. Dit geeft aan

dat claudine-1 mislokalisatie in zichzelf waarschijnlijk niet oorzakelijk is voor de verhoogde intestinale permeabiliteit. In darmepitheelcellen van MIVD-patiënten, drager van een MYO5b mutatie, vonden we een verlies van crumbs3 expressie en daarbij vonden wij in crb3 - / - muizen een mislokalisatie van claudin-1. Dit suggereert dat myosin5b claudin-1 vervoer geassocieerd is met adequate crumbs3-expressie. Belangwekkend is dat het gevonden gebrek aan barrièredefecten in afwezigheid van myosin5b suggereert dat darmepitheelpermeabiliteit niet de oorzaak is van het diarreefenotype in MVID.

Concluderend stellen wij dat ons reductionistische model in staat is kennis op te leveren over morfogenese van darmepitheel, en ons in staat stelt verdere mechanismen achter de geobserveerde fenotypen verder te onderzoeken.

## **Curriculum Vitae**

Leon (Leo Jan) Klunder werd geboren op 4 maart 1989 in Groningen. Alhier deed hij zijn basisschoolopleiding, waar zijn kleuterjuf al noteerde 'als er een makkelijke en een moeilijke weg is, kiest Leon altijd de moeilijke'. Zijn onderwijs carrière zette hij daarna voort in dezelfde stad op het Willem-Lodewijk Gymnasium, waar hij alle ruimte kreeg zijn brede belangstelling te volgen, onder (veel) meer de mogelijkheid om halverwege het vierde jaar alsnog een natuurprofiel te kunnen doen om Geneeskunde te kunnen studeren.

Nu dit besluit was gevallen, was de volgende stap helder: Leon begon aan Geneeskunde te Groningen, en kwam daarbij in aanraking met de Junior Scientific Masterclass, een wetenschappelijk traject naast de bacheloropleiding. Na dit met goed gevolg te hebben afgerond liep hij zijn Stage Wetenschap in het lab van Sven van IJzendoorn. Hieruit vloeide naast een scriptie het artikel voort waarmee hij een aanvraag deed voor een MD/PhD-traject, wat Leon in staat heeft gesteld om zich gelijktijdig in zowel de geneeskunde als de wetenschap te ontwikkelen.

Op dit moment is Leon werkzaam als arts-assistent in een psychiatrisch ziekenhuis in Hilversum, en is van plan in zijn opleiding onderzoek met klinisch werk te combineren.

## Dankwoord

Ieder onderzoek is werk van velen; dit proefschrift vormt daarop zeker geen uitzondering. Alle velen die een bijdrage hebben geleverd; mijn dank is groot! Daarbij wil ik nog een aantal mensen specifiek bedanken.

Allereerst mijn eerste promotor, Sven dank voor je verschillende manieren van inspireren; een open houding die uitnodigt tot samenwerking, een erg scherpe geest die die van anderen aanscherpt tijdens brainstormsessies die willekeurig lang kunnen duren, en je algehele arbeidsethos op de cruciale momenten. Ik ben vereerd je eerste afgeleverde promovendus te zijn.

Dan Gerard, dank voor je nooit aflatende stroom van ideeën, en het zijn van het levende bewijs dat er hoop is voor mensen die proberen de snelheid van hun gedachtenstroom bij te benen door hun spreeknelheid aan te passen, en voor mensen die pogen het artsensbestaan te combineren met wetenschap.

Klaas-Nico, daar jij ook in mijn oppositie zit past het niet je al te veel te bewieroken; toch: dank voor alle kritische vragen; het lezen en met kerende post becommentarieerd terugsturen van alles wat je kant op ging, en het creëren van de ruimte tot interpreteren en heroverwegen in de wekelijks labmeetings.

Dan wil ik graag bedanken; de analisten en medepromovendi van ziekenhuis-research-lab; Janet, Manon, Niels, Julius, Guido, Andrea, Floris, Esther en ieder ander die mij van kort of lang advies of hulp heeft voorzien. Los daarvan, en überhaupt een eigen categorie waard

Tjasso; dank je samenwerking; je gevoel voor humor; de enorme hoeveelheid werk die je hebt gedaan en je algehele enthousiame!

Dan beweegt onze blik zich nu naar de andere kant van de Brug, en dan omhoog;

Daar dank ik de verschillende PI's, Inge, Wia, Jan-Willem, en in eerdere jaren Dick, voor het creëren van een goede sfeer op de 10<sup>e</sup> verdieping waarvan ik met verschillende medepromovendi van heb mogen genieten.

Dank voor dit genieten in de vorm van gamenights, etentjes en vrijmibo's; Inge, Charlotte, Edwin, Arend, Cuifeng, Isabelle; en special thanks to room mates Dennis, Bhagyashree, Peng and in the end Changsen for being a very diverse yet coherent awesome little community.

Ook Karin, Ina en Jenny, dank voor alle praktische hulp en adviezen in de loop der jaren.

Nu dan de blik naar de rest van de wereld;

Dank aan al mijn vrienden; diegenen die al sinds mijn 7<sup>e</sup> meegaan, diegenen die ik via scouting heb leren kennen, Kalliopeanen en subset pubquizzers, en epic emmen. Mede dankzij jullie was en is mijn non-professionele leven ook erg leuk.

Mijn ouders, Joke en Rento; dank voor jullie nooit aflatende steun; en het hebben gegeven van een opvoeding die mij alle ruimte heeft gegeven gelukkig te zijn en mij te ontwikkelen. Mijn zusje Hanne; dank voor het automatisch begrip; of het wat verstoord doorvragen als dat er niet is; dank voor de opmaak van dit boekje; ik ben erg blij je al sinds '91 te kennen.

Inge, mijn lief, dank voor alle steun en relativering, je uithoudingsvermogen in de tijd dat er nog 200 km tussen ons in zat, en wanneer ik dit nu tik. Ik prijs mezelf gelukkig mijn leven nu van dichterbij met je te delen.

Nogmaals; allen bedankt voor deze vormende en inspirerende jaren!



