



## **Samenvatting van het proefschrift**

Nanda Burger-van Paassen

*"Dietary Modulation of Innate Defense"*

**Promotiedatum:** 1 december 2010

**Universiteit:** Erasmus Universiteit  
Rotterdam

**Promotores:**

Prof. dr. J.B. van Goudoever

Prof. dr. H.J.G. Boehm

Necrotiserende enterocolitis (NEC) is een ernstige darmziekte die met name voorkomt bij prematuur geboren neonaten. Ondanks de recente vooruitgang in de zorg voor prematuur geboren neonaten, veroorzaakt NEC een aanzienlijke morbiditeit en mortaliteit. Vanwege het toegenomen aantal zeer immature pasgeborenen en de toegenomen overlevingskansen van pasgeborenen met een zeer laag geboortegewicht (de zogenaemde very low birth weight infants met een geboortegewicht lager dan 1500g; VLBW), zal de NEC incidentie verder stijgen als er geen adequate preventieve therapie gevonden wordt.

Prematuriteit, voeding via het maag-darmkanaal en bacteriële kolonisatie zijn bekende risico factoren voor het ontwikkelen van NEC. Echter, de exacte etiologie is nog grotendeels onbekend. De therapeutische opties zijn beperkt tot ondersteunde therapie en chirurgische interventie en naast borstvoeding bestaat er tot op heden geen preventieve therapie. Aangezien deze ziekte aanzienlijke consequenties heeft voor gezondheidszorg kosten en kwaliteit van leven, is er een dringende behoefte aan een beter begrip van de mechanismen waardoor de ernstige schade veroorzaakt wordt, hetgeen uiteindelijk mogelijk kan leiden tot preventieve en therapeutische interventies.

Dit proefschrift is ingedeeld in twee delen waarbij epitheliale afweermechanismen in de darmen gedurende het vroege postnatale leven in muizen en mensen worden beschreven in deel 1 en het effect van dieet interventies op darmbarrière functie *in vitro* and *in vivo* worden beschreven in deel

Het mucine Muc2 is de structurele component van de mucuslaag in het colon. Uit eerdere studies is bekend dat afwezigheid van Muc2 chronische

colitis veroorzaakt in *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen. De ontwikkeling van colitis gedurende het foetale en/ of vroeg postnatale leven was tot heden nog niet onderzocht. Wij beschrijven dat *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen in utero geen tekenen van colitis vertonen. De eerste subtiele tekenen van colitis, namelijk influx van Cd3-positieve T-cellen, werden gezien op de postnatale leeftijd van 1.5 dag in het distale colon. In wildtype muizen (WT) werd een verhoogde influx van T-cellen gezien op de postnatale leeftijd van 14 dagen, hetgeen naar alle waarschijnlijkheid veroorzaakt wordt door een fysiologische ontstekingsreactie. Op de leeftijd van 21 dagen worden muizenpups gescheiden van hun moeder en verandert de voeding van moedermelk naar vast voedsel. Deze overgang wordt 'spenen' genoemd. In *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen sprake van een toename van het aantal Cd3-positieve T-cellen na spenen. In *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen was er voor spenen reeds sprake van een krachtige immuun-respons, waarbij pro-inflammatoire cytokines in balans gehouden werden door anti-inflammatoire cytokines en immuunsuppressieve factoren. Er was daarbij geen uitgesproken dominantie van een van de specifieke T helper (th) cellen Th1, Th2 of Th17. Na spenen, op de leeftijd van 28 dagen, was de expressie van *Foxp3*, *Il-12 p35*, *Tgfβ1*, and *Tnf-α* significant verlaagd in *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen vergeleken met de expressie voor spenen, terwijl *Il-10* gen-expressie behouden bleef. Hierdoor lijkt de Th2 immuunrespons op deze leeftijd een prominente rol te spelen. Vanaf de leeftijd van 21 dagen werden er milde morfologische verschijnselen van colitis gezien, zich uitend in toegenomen crypt lengte en toegenomen influx van CD3-positieve T-cellen. Ernstige colitis-verschijnselen, zoals verdere toename van cryptlengte, persisterende aanwezigheid van toegenomen aantallen Cd3-positieve T-cellen, epitheliale afvlakking en oppervlakkige erosie van het epitheel, werden waargenomen vanaf de leeftijd van 28 dagen. Met behulp van kwantitatieve RT-PCR (qRT-PCR) werd aangetoond dat expressie profielen van de Toll-like receptoren (Tlr) Tlr2, Tlr4 en Tlr9 en goblet-cel specifieke eiwit-expressie beïnvloed worden door spenen en correleren met de toename van de ernst van colitis verschijnselen in *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen.

Genexpressie profielen werden bestudeerd met behulp van microarrays. Een groot deel van genen die sterk verhoogd tot expressie kwamen in *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen op de leeftijd van 2 en 4 weken, waren betrokken bij immuunresponsen die gerelateerd zijn aan antigeenverwerking en -presentatie, B-cel en T-cel receptor signaling, leucocyte transendotheel migratie en Jak-STAT signaling. Met name de mRNA expressie van immuunglobulines, murine histocompatibility-2, pro-inflammatoire cytokines en antimicrobiële eiwitten was sterk verhoogd in *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen. Daarnaast was de expressie van genen die betrokken zijn bij celstructuur gerelateerde pathways significant verschillend van WT muizen op de leeftijd van 4 weken. Vooral het tight-junction geassocieerde gen claudin-10 kwam verhoogd tot expressie, terwijl claudin-1 en claudin-5 juist verlaagd tot expressie werden gebracht. Bovendien vertoonden 4 weken oude *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen een verhoogde expressie van genen die celgroei reguleren, tezamen met verhoogde cryptlengte en verhoogde epitheliale proliferatie. Met behulp van

deze data werd aangetoond worden dat er verschillende fasen van colitis ontwikkeling zijn in *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen.

Uit de bovengenoemde genexpressie studie bleek dat de expressie van antimicrobiële eiwitten zoals de zogenoemde regenerating genes *Reg3β* and *Reg3γ*, en angiogenin-4 (*Ang4*) verhoogd tot expressie komen in 2 en 4 weken oude *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen. Deze genen werden daarom in verder detail bestudeerd. Hierbij was het doel om de gevolgen van *Muc2*-deficiëntie op de expressie van de anti-bacteriële eiwitten *Reg3β*, *Reg3γ* en *Ang4* in de darmen te bestuderen. De afwezigheid van *Muc2* veroorzaakte een sterk verhoogde expressie van *Reg3β* en *Reg3γ* mRNA in de dunne darm en het colon. De expressie van *Reg3β*, *Reg3γ* en *Ang4* mRNA in de dunne darm en het proximale colon was verhoogd ten opzichte van het distale colon. Daarnaast was de expressie van *Reg3β*, *Reg3γ* en *Ang4* mRNA verlaagd op de leeftijd van 4 weken ten opzichte van 2 weken in het distale colon van *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen. Dit is met name interessant omdat morfologische tekenen van colitis met name in het distale colon gezien worden. Met behulp van *in situ* hybridisatie en immunohistochemie werd aangetoond dat *Reg3β*, *Reg3γ* en *Ang4* tot expressie gebracht worden in Paneth cellen in de dunne darm en enterocyten en goblet cellen in zowel dunne darm als colon. Met name de expressie van antimicrobiële eiwitten in goblet cellen benadrukt een nieuwe en belangrijke rol voor goblet cellen in de aangeboren afweer van de darmen. Tezamen suggereren deze data dat *Reg3* eiwitten en/ of *Ang4* darmontsteking/ darmschade beperken.

Paneth cellen produceren antimicrobiële eiwitten die een belangrijk onderdeel vormen van de afweer in de darmen, in het bijzonder de zogenoemde aangeboren afweer of 'innate defense'. De aanwezigheid van Paneth cellen, de expressie van antimicrobiële eiwitten en ontwikkelingsgerelateerde veranderingen hierin werd bestudeerd in premature neonaten met NEC. Tevens wordt de aanwezigheid en antimicrobiële activiteit van Paneth cel producten in stomavloeistof van NEC patiënten gemeten. Darmweefsel van NEC patiënten en premature en à terme controle patiënten met een aangeboren of verworven darmafwijking zoals atresie, malrotatie en gastroschisis, werd verzameld gedurende chirurgische resectie van darmweefsel en gedurende reanastomose van het stoma na herstel van de acute ziekteperiode. Gedurende de acute fase van NEC was het aantal Paneth cellen in de dunne darm verminderd ten opzichte van premature controle patiënten. Na herstel van NEC werd er Paneth cel hyperplasie aangetoond in de dunne darm, hetgeen bevestigd werd door een toegenomen expressie van HD5 mRNA in het ileum. In het colon was er sprake van metaplasie, aangezien er Paneth cellen aangetoond werden, waar deze bij gezonde individuen alleen aanwezig zijn in de dunne darm. In stomavloeistof konden Paneth cel eiwitten worden aangetoond die groei van bacteriën remden. De inductie van Paneth cel hyperplasie en metaplasia gedurende de herstelfase van NEC is suggestief voor een toegenomen capaciteit van het innate defense system in reactie op uitgestelde ontsteking. Dit bevestigt het belang van Paneth cellen in innate defense en suggereert dat toegenomen eiwit

expressie en secretie van Paneth-cell producten bijdraagt aan de genezing van NEC.

Aan het gebruik van probiotica worden verschillende positieve effecten toegeschreven. Echter, het exacte werkingsmechanisme is nog grotendeels onbekend. Derhalve wordt in bestudeerden wij het effect van het probioticum *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGGs) op MUC2 synthese in LS174T cellen, een humane goblet cel-achtige cellijn. Behandeling van LS174T cellen met LGG resulteerde in een dosisafhankelijke toename van de hoeveelheid MUC2 mRNA en MUC2 promoter transactivatie. Levende LGGs induceerden een sterkere toename in MUC2 expressie en MUC2 promoter transactivatie vergeleken met geïnactiveerde LGGs. Stimulatie van LS174T cellen met LGG-CM veroorzaakte eveneens een toename in de hoeveelheid MUC2 mRNA en MUC2 promoter transactivatie. Het gegeven dat zowel levende als geïnactiveerde bacteriën een krachtig stimulerend effect hebben op MUC2 synthese is met name interessant voor het gebruik van probiotica in klinische studies, aangezien veiligheid van probiotica behandeling een terugkerend probleem is. Geïnactiveerde bacteriën of metabole eindproducten van bacteriële fermentatie zijn wellicht veelbelovend in dit opzicht. De definitie van probiotica als 'levende bacteriën' staat in dit licht ter discussie.

Biochemische voorbehandeling van het LGG-CM had geen effect op de hoeveelheid MUC2 mRNA. Ook werd er geen verlies van MUC2 promoter transactivatie gezien. Een en ander impliceert dat bacterieel DNA en gesecreteerde eiwitten niet als de biologisch actieve stoffen aangemerkt kunnen worden.

Korte keten vertzuren, de zogenoemde short chain fatty acids (SCFAs) worden met name in de dikke darm gevormd door bacteriële fermentatie van onverteerde koolhydraten. SCFAs, in het bijzonder butyraat, propionaat en acetaat, zijn de voornaamste anionen in het lumen van de dikke darm. Stimulatie van LS174T cellen met korte keten vetzuren, de zogenoemde short chain fatty acids (SCFA) zoals die gemeten werden in LGG-CM veroorzaakte een toegenomen MUC2 promoter transactivatie. Daarbij bleek een combinatie van de verschillende SCFAs effectiever vergeleken met de individuele SCFAs, hetgeen een synergistisch effect impliceert.

Het effect van SCFAs op mucine synthese werd in verder detail bestudeerd. Hierbij werd aangetoond dat stimulatie van LS174T cellen met een lage concentratie butyraat (1 mM) mucine synthese stimuleert, terwijl gematigde tot hoge concentraties (5-15 mM) de hoeveelheid MUC2 mRNA juist terug laten keren naar basale waarden. Het laatste is vooral interessant in het licht van de butyraat concentratie in ontlasting van pasgeborenen, waarbij in pasgeborenen die flesvoeding krijgen een hogere butyraat concentratie gemeten wordt dan bij kinderen die moedermelk krijgen. Propionaat en acetaat induceerden ook de synthese van MUC2. Echter, bij concentraties van 5-15 mM bleef de hoeveelheid MUC2 mRNA gelijk. Vervolgens werden de mechanisme die het butyraat gemedieerde effect op MUC2 synthese reguleren bestudeerd. SCFA-gevoelige regio's en *cis*-elementen in de MUC2 promoter werden geïdentificeerd met behulp van

transfectie assays en gel-shift assays. Hierbij werd een actief AP-1 (c-Fos/c-Jun) *cis*-element ter hoogte van -818/-808 gevonden die het stimulerende effect van butyraat veroorzaakt. Het effect van butyraat op epigenetische veranderingen werd bestudeerd met behulp van chromatine immuunprecipitatie assays, waarbij MUC2 regulatie door hoge concentraties butyraat geassocieerd was met toegenomen acetylatie van histon H3 en H4 en methylatie van H3 op de MUC2 promoter.

In eerdere experimenten van van der Sluis et al. en Velcich et al. werd duidelijk dat het fenotype van de *Muc2*<sup>-/-</sup> muis variabel is. Aanvankelijk werd dit gewijd aan de genetische achtergrond van het muismodel. Echter, dit kon de zeer wisselende fenotypes niet geheel verklaren. Vanuit humane studies is bekend dat voeding een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van NEC en de behandeling van IBD. Daartoe het effect van twee verschillende diëten en het effect van probiotica substitutie op de ernst van colitis-verschijnselen in *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen bestudeerd. *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen en WT muizen kregen na spenen een semi-synthetisch dieet (AIN-93G), een niet-synthetisch dieet (standaard knaagdierenvoer) of een niet synthetisch dieet gesupplementeerd met probiotica (*Bifidobacterium breve* en *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* in eindconcentratie van 1x10<sup>9</sup>CFU/dier/dag) of controle (maltodextrine) gedurende 5 weken. De diëten verschillen met name in de hoeveelheid vezels, waarbij het semi-synthetische dieet 60% minder vezels bevat vergeleken met het niet-synthetische dieet. Daarnaast bestaat het semi-synthetische dieet voornamelijk uit caseïne eiwit en het niet-synthetische dieet uit planteiwit. Het type dieet veroorzaakte geen significante verschillen in lichaamsgewicht, crypt lengte of influx van immuuncellen in WT muizen. Echter, in *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen resulteerde het semi-synthetische dieet in verminderde ziekte-ernst, zich uitend in een hoger lichaamsgewicht en afgenomen cryptlengte, vergeleken met het niet-synthetische dieet. De laatstgenoemde groep vormt een intermediaire groep tussen de gezonde WT muizen en de *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen met ernstige colitis-verschijnselen die het niet-synthetische dieet kregen. In *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen die gesuppleerd werden met probiotica, werd een reductie van de cryptlengte gezien, vergeleken met de dieren die het controle mengsel kregen. Echter, er werden na probiotica toediening geen verschillen gezien in klinische verschijnselen zoals lichaamsgewicht, macroscopisch bloedverlies of diarree. Tenslotte vertoonden *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen die het semi-synthetische dieet kregen een verminderde influx van S100a8 en S100a9 (waarvan de dimeer calprotectin genoemd wordt; een maat voor ontsteking in de darmen) en CD3 positieve T-cellen als marker voor ontsteking, vergeleken met *Muc2*<sup>-/-</sup> muizen die het niet-synthetische dieet of het niet-synthetische dieet gesuppleerd met probiotica kregen, hetgeen eveneens wijst op een verminderde ziekte-activiteit in *Muc2*<sup>-/-</sup> dieren die het semi-synthetische dieet kregen. De bevindingen van dit hoofdstuk benadrukken het belang van de dieet-keuze in dierexperimenten, aangezien het ziektemodel aanzienlijk beïnvloed kan worden door het dieet.

MUC2 is voornaamste secretoire mucine in menselijke darm en wordt gesynthetiseerd door goblet cellen. Het eiwit Muc2 in de darm wordt

gekenmerkt door tandem repeats van de aminozuren threonine, proline en serine. De grote hoeveelheden threonine die worden ingebouwd in eiwitten van de darm kunnen de Muc2 synthese in de gobletcellen van de darm weerspiegelen. In eerdere studies werd reeds aangetoond dat systemische/arteriële snel geïncorporeerd wordt in MUC2 in de dunne darm van prematuur geboren neonaten. Echter, tot op heden was onbekend of goblet cellen in staat zijn om threonine vanuit de lumenale zijde van de darm op te nemen voor MUC2 synthese. In deze studie werd de voorkeursplaats voor absorptie van threonine voor MUC2 synthese in preterme biggen en preterme neonaten met een ileostomie bestudeerd met behulp van de infusie van twee stabiele isotopen. Zowel threonine van de basolaterale zijde als de lumenale zijde werd gebruikt voor MUC2 synthese in preterme neonaten en biggen. In preterme biggen werden hogere synthesesnelheden van MUC2 gezien vergeleken met preterme neonaten in de herstelfase van darmziekte en bijbehorende chirurgische interventie. Colostrum stimuleert de opname van threonine voor MUC2 synthese vanuit de lumenale zijde ten opzichte van de basolaterale zijde en een toegenomen fractionele synthesesnelheid van MUC2 vergeleken met kunstvoeding. Hieruit kan geconcludeerd worden dat goblet cellen threonine zowel vanuit de lumenale zijde als vanuit de basolaterale zijde van de goblet cel gebruiken voor MUC2 synthese. Daarnaast stimuleert colostrum de synthese van MUC2 en de opname van threonine vanuit de lumenale zijde. ◀