

VU Research Portal

Experimental colitis and translation to human inflammatory bowel disease

Zwiers, A.

2008

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Zwiers, A. (2008). *Experimental colitis and translation to human inflammatory bowel disease*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

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.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

SAMENVATTING

Chronisch inflammatoir darmlijden, beter bekend onder de engelse naam “Inflammatory Bowel Disease” (IBD) is de gemeenschappelijke noemer voor twee afzonderlijke ziektebeelden, de ziekte van Crohn (Engels: Crohn’s disease, CD) en colitis ulcerosa (Engels: ulcerative colitis, UC). Het betreft chronische ontstekingen van het maagdarmkanaal waarvan de precieze oorzaak nog grotendeels onbekend is en waarvoor tot op heden geen genezing bestaat. Het tegenwoordig algemeen aanvaarde werkmodel is dat het hier gaat om een uit de hand gelopen reactie van het immuun(afweer)systeem op normale, dus niet-ziekteverwekkende, bestanddelen van bacteriën die aanwezig zijn in de darm.

Onderzoek in families waarin IBD voorkomt en onderzoek bij tweelingen maakten duidelijk dat erfelijkheid een belangrijke rol speelt bij de gevoeligheid tot het krijgen van de ziekte. Deze onderzoeken maakten ook duidelijk dat het hierbij niet gaat om één grote afwijking in het erfelijk materiaal (DNA) maar om een optelsom van verschillende, kleinere afwijkingen die in combinatie met niet erfelijke, uitwendige factoren als leefwijze en samenstelling van de darmflora, het uiteindelijke beeld van de ziekte bepalen, met andere woorden het betreft bij IBD een multifactoriële ziekte.

Om te kunnen komen tot een verbetering in de behandeling en wellicht zelfs genezing is het nodig meer inzicht te krijgen in de bijdrage van elk van deze factoren en hoe deze op elkaar inwerken.

Bij zulk onderzoek bewijzen diermodellen grote diensten, immers bij het gebruik van dezelfde (muizen) stam zijn de dieren in erfelijk opzicht gelijk aan elkaar en daarnaast kan men omgevingsfactoren zoals dieet en medicijnen volledig zelf in de hand houden.

Het diermodel waarvan wij gebruik gemaakt hebben bij onze studies is het TNBS colitis model. Dit is een zogenaamd induceerbaar model wat betekent dat een op CD lijkend ziektebeeld opgewekt kan worden door rectale toediening van trinitrobenzeen sulfonzuur (TNBS). Van groot belang voor onze studies was het feit dat niet elke muizenstam even gevoelig is voor behandeling met TNBS. Zo ontwikkelt de SJL/J stam binnen 4 dagen een ernstige, zowel macroscopische als microscopische ontsteking van de dikke darm (colitis) die gepaard gaat met ernstig gewichtsverlies terwijl de C57Bl/6 stam na een aanvankelijk gewichtsverlies snel herstelt en na 4 dagen weer op het oude gewicht is teruggekeerd en de darm er weer normaal uitziet. Het is daarom van belang omdat dit verschil tussen stammen wijst op een erfelijk verschil voor gevoeligheid of ongevoeligheid voor colitis. En inderdaad, in voorafgaand onderzoek hebben we aangetoond dat er twee plaatsen (loci) zijn in het

erfelijke materiaal (chromosomen, structuren die het DNA bevatten) die bepalend zijn voor het gevoelig of ongevoelig zijn voor dit type colitis. Deze gevoeligheidsgebieden liggen op de muizenchromosomen 9 en 11. Elk van deze gebieden bevat zelf weer een groot aantal genen (gebieden die coderen voor een erfelijke eigenschap) en elk zo'n gen zou de onderliggende oorzaak voor de ziekte kunnen wezen. In de studies die ten grondslag liggen aan dit proefschrift hebben we geprobeerd die specifieke genen te identificeren en hun (afwijkende) werking te verklaren. Daarnaast hebben we onderzocht of onze bevindingen ook van belang zouden kunnen zijn voor de situatie bij de mens.

Eén van de genen in het gebied op chromosoom 11 codeert voor Interleukine-12-p40, een eiwit dat onderdeel uitmaakt van twee bekende ontstekingsfactoren namelijk Interleukine-12 en Interleukine-23. Van deze ontstekingsfactoren is bekend dat ze een centrale rol spelen bij zowel TNBS colitis als bij de ziekte van Crohn. Dit wordt duidelijk geïllustreerd door het feit dat behandeling met stoffen die specifiek de werking van Interleukine-12p40 neutraliseren de ernst van de ziekte doet afnemen en in geval van TNBS colitis zelfs kan genezen.

In **hoofdstuk 2** hebben we onderzocht of twee kleine verschillen in de genstructuur (zgn polymorfismen) van Interleukine-12p40 tussen beide muizenstammen van invloed kunnen zijn op de werking van Interleukine-12 en ten grondslag kunnen liggen aan hun verschil in gevoeligheid voor de ziekte. Hiertoe hebben we twee verschillende genconstructen gemaakt die, eenmaal in gekweekte cellen gebracht, in staat zijn biologisch actief Interleukine-12 te maken, het ene genconstruct maakt Interleukine-12 met de Interleukine-12p40 vorm van de C57Bl/6 stam en het andere construct maakt de variante vorm zoals aanwezig in de SJL/J stam. Het bleek nu dat de cellen met het "SJL/J" construct meer biologisch actief Interleukine-12p70 konden vormen dan cellen met het "C57Bl/6" construct. Wij verklaren dit uit het volgende: biologisch actief Interleukine-12 bestaat uit twee subeenheden namelijk Interleukine-12p40 en Interleukine-12p35 en om hieruit de actieve vorm te krijgen moeten de beide eenheden dicht genoeg bij elkaar komen om een chemische binding aan te kunnen gaan (een zgn zwavelbrug te vormen). De genetische verandering bij de SJL/J muis heeft er nu voor gezorgd dat deze toenadering veel efficiënter kan gebeuren zodat in dezelfde tijdsspanne meer actief Interleukine-12 kan worden gevormd dan bij het Interleukine-12 afkomstig uit de C57Bl/6 muis. Dit betekent dat bij een zelfde prikkel de SJL/J stam heftiger zal reageren dan de C57Bl/6 stam. Met andere woorden, onder extreme omstandigheden, zoals bij een behandeling met TNBS, is het denkbaar dat de SJL/J stam

zoveel Interleukine-12 aanmaakt dat het ontstekingsproces een “point of no return” overschrijdt en niet meer gestopt kan worden, terwijl dit bij de C57Bl/6 nog wel kan.

De mogelijke betrokkenheid van Interleukine-12p40 bij TNBS colitis deed ons besluiten te onderzoeken of dit ook het geval is bij de mens. Dit wordt beschreven in hoofdstukken 3 en 4.

In **hoofdstuk 3** onderzochten we of een polymorfisme in het menselijke Interleukine-12p40 gen, net zo als bij de SJL/J muis, betrokken is bij een verhoogde productie van het actieve Interleukine-12. Hiertoe maten we de productie van Interleukine-12 bij monocytten, een type witte bloedcellen dat betrokken is bij ontstekingsprocessen.. We vonden inderdaad dat mensen die deze variatie in hun erfelijk materiaal hebben een hogere productie van Interleukine-12 lieten zien dan mensen die deze variatie niet hadden. Opvallend was hierbij dat dit niet samenging met een hogere productie van Interleukine-12p40, wat erop zou kunnen wijzen dat, net zoals bij de SJL/J muis, er sprake is van een efficiëntere vorming van Interleukine-12. Vervolgens hebben we gekeken of er een associatie bestaat tussen dit polymorfisme en het voorkomen van de ziekte van Crohn. Hiertoe hebben we onderzocht of de variante vorm veel vaker voorkomt bij mensen die de ziekte hebben dan bij mensen die de ziekte niet hebben. Zo'n verschil hebben we, in de kleine onderzochte groep, niet kunnen vinden.

In **hoofdstuk 4** hebben we gezocht of er andere polymorfismen in het Interleukine-12p40 gen aanwezig waren. We vonden een polymorfisme dat weliswaar niet in het gen zelf lag, maar wel in een gebied dat belangrijk is voor de regulatie van de activiteit van het gen. Vervolgens hebben we een grote groep families met tenminste één aangedaan kind (464) en gezonde controles (520) geanalyseerd op het voorkomen van deze variant. In onze analyses hebben we ook de in hoofdstuk 3 genoemde variant en een door een andere onderzoeksgroep beschreven variant betrokken. We vonden niet dat één van de variante vormen duidelijk meer aanwezig was bij de zieke groep (wat een aanwijzing zou zijn voor associatie) dan bij de gezonde controle groep en moesten hierom concluderen dat er geen aanwijzingen waren voor de betrokkenheid van het Interleukine-12p40 gen bij IBD. Recentere internationale studies in zeer grote groepen van patiënten hebben echter aangetoond dat er wel degelijk een relatie blijkt te bestaan met dit gen. De reden dat wij deze niet gevonden hebben, was dat deze variaties maar bij een deel van de patiënten voorkomen en door de grootte van de door ons onderzochte groepen niet genoeg statistische “power” gaven om door ons opgepikt te worden.

Toekomstige studies zullen moeten aantonen wat de associatie met dit gen veroorzaakt, met andere woorden of het door ons bij de muis gevonden mechanisme ook bij de mens verantwoordelijk is voor de associatie met CD.

Zoals bovenstaand al aangegeven betreft het bij IBD een multifactoriële ziekte waarbij meerdere genen betrokken zijn. Dit geldt ook voor het TNBS colitis model. Naast (waarschijnlijke) betrokkenheid van het Interleukine-12p40 gen op chromosoom 11 had voorafgaand onderzoek ook gewezen op betrokkenheid van een gen op chromosoom 9. De hoofdstukken 5 en 6 handelen over de zoektocht naar een betrokken gen in dit gebied.

Elke cel in een levend organisme bevat alle genetische informatie van dat individu, toch zal het meteen duidelijk zijn dat niet al die informatie in elke cel tot uiting komt; in een levercel zullen andere genen actief zijn (tot expressie komen) dan in bijvoorbeeld een zenuwcel. Met andere woorden, de expressie van een gen is gereguleerd. Er zijn technieken om dit verschil in genactiviteit tussen verschillende weefsels te meten, één van deze technieken is de micro-array techniek (DNA chips). Wij hebben deze techniek gebruikt om het verschil in expressie tussen ontstoken en niet ontstoken darmweefsel van 21.000 genen bij de SJL/J muis te onderzoeken.

Vanzelfsprekend zal het merendeel van de veranderde genexpressie een gevolg en niet de onderliggende oorzaak zijn van de ontsteking, toch kan dit algemene “ontstekingsprofiel” waardevolle informatie opleveren wanneer dit profiel vergeleken wordt met “ontstekingsprofielen” van andere ziekten. Een dergelijke vergelijking hebben wij in **hoofdstuk 5** uitgevoerd. De genexpressie van het TNBS colitis model is hierin vergeleken met die van humaan IBD (ziekte van Crohn en colitis ulcerosa), van coeliakie (een darmontsteking bij de mens als gevolg van overgevoeligheid voor gluten – eiwitten uit granen) en van reumatoïde artritis (RA). Een analyse die speciaal kijkt naar netwerken van genen die samen betrokken zijn bij een biologisch proces zoals bijvoorbeeld “ontsteking” liet een verschil zien tussen enerzijds TNBS colitis, IBD en reumatoïde artritis en anderzijds coeliakie. Waar de eerstgenoemden een sterke activering van genen lieten zien die betrokken zijn bij “immunititeit” en “verdediging” was dit bij coeliakie veel minder het geval.

Een andere analyse die we toegepast hebben betrof het verschil in gebruik van zogenaamde transcriptiefactoren. Verhoogde of verlaagde activiteit van een gen wordt namelijk geregeld door deze “transcriptiefactoren”. Groepen van genen die beïnvloed worden door dezelfde transcriptiefactor(en) kunnen wijzen op een onderliggend gemeenschappelijk

regulerend mechanisme. Ook deze analyse liet een verschil zien tussen coeliakie en de andere ziekten. Zowel bij TNBS colitis als bij UC en RA werd verhoogde expressie gevonden van genen die onder invloed staan van Ets2, een transcriptiefactor die betrokken is bij de verhoogde productie van pro-inflammatoire ontstekingsfactoren. Deze waarneming zou kunnen wijzen op betrokkenheid van deze factor bij de overgang, en daaropvolgende handhaving, van de acute fase naar de chronische fase van deze ziekten. Bij coeliakie echter stonden de meeste genen onder invloed van een andere transcriptie factor namelijk, GLI. GLI maakt deel uit van een familie van eiwitten die betrokken zijn bij weefselvorming. Eén van de kenmerken van coeliakie is een verhoogde aanmaak van darmepitheel-cellen die uiteindelijk leidt tot het verdwijnen van de darmvlokken (villi), structuren die van belang zijn voor goede opname van voedsel. Wellicht staat deze verhoogde celgroei dus in verband met de betrokkenheid van deze transcriptiefactor.

In **hoofdstuk 6** hebben we onze aandacht gericht op de genen die gelegen zijn in het gebied op chromosoom 9. We hebben daarbij gezocht naar genen die een verandering in activiteit lieten zien en op grond van hun functie een rol zouden kunnen spelen. Zo'n associatie vonden we met het gen dat codeert voor claudine-18. Claudine-18 is een interessant kandidaatgen omdat het codeert voor een "tight junction" eiwit. "Tight junctions" zijn verbindingen tussen cellen die vooral voorkomen bij weefsels die een afschermdende functie hebben zoals de bekleding van bloedvaten en darmen. Deze verbindingen reguleren deels de passage van water en opgeloste stoffen en spelen hiermee een belangrijke rol bij het verhinderen van direct contact tussen darminhoud (denk aan bacteriën) en het verdedigingssysteem van het lichaam. Het is dan ook goed denkbaar dat een ontregelde "tight junction" werking betrokken is bij gevoeligheid voor colitis. Recentelijk zijn hiervoor ook aanwijzingen gevonden toen bleek dat een ander tight-junction eiwit, claudine-2, sterk opgereguleerd was bij IBD patiënten met actieve ziekte. Bij ons onderzoek met de micro-array's vonden we dat het claudine-18 gen een sterk verhoogde expressie liet zien in de ontstoken darm. Een aanwijzing dat dit gen echt betrokken kan zijn bij gevoeligheid voor colitis vonden we toen we de genactiviteit van de gevoelige (SJL/J) stam met die van de resistente (C57Bl/6) stam vergeleken. Het bleek dat bij de C57Bl/6 muizen de opregulatie veel sneller plaatsvond, al na 4 uur, terwijl dit bij de SJL/J pas na 8 uur gevonden werd. Wij speculeren dat deze opregulatie onderdeel uitmaakt van een verdedigings- of reparatiemechanisme waarbij claudine-18 een rol speelt bij het, tijdelijk, losser maken van de

“tight junction”. Dit losser maken is van belang bij reparatie en verdediging omdat nieuw gevormde cellen het weefsel in moeten kunnen migreren en omdat immuuncellen er langs moeten kunnen om hun verdedigend werk te doen. Dit losser worden moet natuurlijk strikt geregeld zijn omdat altijd het gevaar dreigt dat bacteriën vanuit de darm naar binnen kunnen migreren. Door de snellere reactie van de C57Bl/6 stam zou deze stam beter in staat zijn zo’n invasie adequaat het hoofd te bieden met als uiteindelijk gevolg een verhoogde kans op herstel van colitis.

Dat ook in de menselijke situatie claudine-18 een rol kan spelen, blijkt uit onze waarneming dat bij patiënten met colitis ulcerosa een duidelijk hogere activiteit van het claudine-18 gen wordt waargenomen dan bij een controle groep. Wij concluderen dan ook dat claudine-18 een rol speelt in zowel een diermodel als in humane IBD.

Concluderend kunnen we zeggen dat wanneer we de bevindingen van hoofdstuk 2 en 6 combineren we het mechanisme achter de hogere gevoeligheid van de SJL/J stam tot op moleculair niveau begrijpelijk kunnen maken. Een ontregeling van de “tight junction” functie door een veranderde genactiviteit maakt een grotere verplaatsing van darmbacteriën naar het eronder liggende darmweefsel mogelijk waar het vervolgens in contact komt met een immuunsysteem dat weer heftiger kan reageren omdat het meer van het ontstekingsbevorderende Interleukine-12 kan aanmaken. Dit verhoogde aanbod enerzijds en de heftiger ontstekingsreactie anderzijds zal uiteindelijk uitmonden in een chronische ontsteking en colitis.

In **hoofdstuk 7** tenslotte, worden de resultaten van dit proefschrift besproken in relatie tot wat er bekend is in de literatuur.