

Cel-matrix-interacties in longfibrose

Fibrose is een belangrijke component van veel dodelijke ziekten. Het wordt gekenmerkt door overmatige aanmaak van extracellulaire matrix, wat zowel de architectuur als de functie van het weefsel beïnvloedt. De meest voorkomende vorm van fibrose in de long is idiopathische longfibrose (IPF), een ziekte met een 5-jaar overlevingskans van ongeveer 20% en daarmee een hogere mortaliteit dan veel soorten kanker.

Tijdens de ontwikkeling van longfibrose verandert zowel de compositie als de structuur van de extracellulaire matrix. De cellen verantwoordelijk voor de aanmaak en het onderhoud van deze matrix zijn de fibroblasten. Deze cellen differentiëren onder profibrotische omstandigheden naar een myofibroblast fenotype, gekenmerkt door verhoogde expressie van *α -smooth muscle actin*. Dit proces van myofibroblastdifferentiatie is ten dele gereguleerd door de chemische en mechanische eigenschappen van de extracellulaire matrix. Dit resulteert in een wederkerige relatie tussen cellen en matrix, waarbij beide elkaar beïnvloeden.

Tot nu toe is er geen effectieve behandeling ontwikkeld tegen IPF. Onze hypothese is dat dit te maken heeft met de klassieke focus op oplosbare factoren die betrokken zijn bij het fibrotische proces. Gezien de huidige aanwijzingen voor een regulerende rol voor de extracellulaire matrix in de ontwikkeling van fibrose, stellen wij voor om therapeutische interventie juist op deze extracellulaire matrix te richten. Om dit mogelijk te maken zijn er in dit proefschrift verschillende aspecten van de complexe relatie tussen matrix en cellen nader onderzocht in de context van de ontwikkeling van longfibrose.

In **hoofdstuk 2** is de ontwikkeling van longfibrose onderzocht in een muismodel waarin longfibrose werd opgewekt door instillatie van bleomycine in de longen. Qua veranderingen in de matrix hebben we ons geconcentreerd op de meest gerapporteerde verandering in de extracellulaire matrix: de aanmaak van collageen, wat we gemeten hebben met behulp van de incorporatie van zwaar water in hydroxyproline. Qua cel-gerelateerde veranderingen hebben we de genexpressie in de longen van dezelfde muizen gemeten met behulp van *microarrays*. Hierdoor konden we de veranderingen op matrix- en celniveau aan elkaar correleren om zo veranderingen in genexpressie te identificeren die gerelateerd zijn aan de veranderingen op matrixniveau. Op deze manier hebben we een genexpressieprofiel gecreëerd, dat kenmerkend is voor fibrose in de long. Collageenaanmaak was hoog gecorreleerd met een aantal genen gerelateerd aan de extracellulaire matrix, zoals thrombospondine 2, wat een rol speelt in fibrilvorming, lysyl oxidase, van belang voor de vorming van *crosslinks* tussen collageen moleculen, en het collageen-afbrekende enzym matrix metallopeptidase 14. Collageenaanmaak was bovendien hoog gecorreleerd met een aantal genen waarvan geen rol bekend is in de remodelering van de extracellulaire matrix. Het feit dat deze genen ook *in vitro* een verhoogde expressie lieten zien na TGF β ₁-

geïnduceerde myofibroblastdifferentiatie, suggereert betrokkenheid van deze genen bij het proces van longfibrose. Hierdoor komen deze genen in aanmerking als interessante doelwitten voor toekomstig onderzoek naar voor fibrose relevante processen.

In het genexpressieprofiel van fibrose waren verschillende extracellulaire matrixeiwitten opgeregeerd in de longen van muizen met een hoge fibrose-activiteit. Elastine was het gen dat het hoogst gecorreleerd was. Daarnaast waren ook type V collageen en tenascine C hoog gecorreleerd aan collageenaanmaak. In **hoofdstuk 3** zijn deze drie eiwitten nader onderzocht. Eerst hebben we de aanwezigheid van elastine, type V collageen en tenascine C op eiwitniveau bevestigd in histologische coupes van de longen van muizen met bleomycine-geïnduceerde longfibrose. De hoeveelheid elastine nam toe tot tenminste 5 weken na de inductie van fibrose, terwijl kleuring van tenascine C en type V collageen in eerste instantie toenam, maar na 3 weken weer verminderde. Aangezien genexpressie ook *in vitro* verhoogd was in humane longfibroblasten gekweekt onder fibrotische omstandigheden, te weten in de aanwezigheid van TGF β_1 , hebben we geponeerd dat fibroblasten en myofibroblasten verantwoordelijk zijn voor de verhoogde expressie van deze matrixeiwitten. Tot slot hebben we een profibrotisch effect van extracellulair elastine geïdentificeerd, door longfibroblasten te kweken op een elastinelaag waarna expressie van type I collageen toenam en tevens de expressie van het voor myofibroblasten kenmerkende eiwit *α -smooth muscle actin*.

Tijdens de ontwikkeling van fibrose in de longen treden ook veranderingen op in de mechanische eigenschappen van het weefsel. Door de aanmaak van relatief grote hoeveelheden extracellulaire matrix en een verandering van de structuur neemt de stijfheid van het weefsel toe. Deze verhoogde stijfheid beïnvloedt de mechanische belasting die longcellen ondervinden tijdens de ademhaling: stijvere delen van de long zullen minder vervormen, waardoor de fibroblasten aan minder cyclische mechanische belasting worden blootgesteld. In **hoofdstuk 4** laten we zien dat deze afname in cyclische mechanische belasting een toename veroorzaakt in myofibroblastdifferentiatie, aangezien het de genexpressie van de *α -smooth muscle actin* en type I collageen in humane longfibroblasten verhoogt. Cyclische mechanische belasting veranderde niet de genexpressie van de ED-A splitsingsvariant van fibronectine, maar verlaagde wel de paracriene expressie van TGF β_1 , wat een mogelijk regulerend mechanisme voor de gevonden effecten kan zijn. Dit hoofdstuk toont aan dat cyclische belasting die longcellen in een gezonde omgeving ondervinden, kan voorkomen dat fibroblasten naar myofibroblasten differentiëren.

Hoofdstuk 5 geeft een overzicht van de literatuur over een mogelijke betrokkenheid van het membraangebonden eiwit caveoline in fibrose. Het is bekend dat er al voor het begin van fibrose minder caveoline aanwezig is in weefsels. Dit suggereert een rol in de

ontwikkeling van fibrose. Caveoline is noodzakelijk voor de vorming van zogenaamde caveolae – instulpingen in de plasmamembraan rijk in cholesterol en signaalmoleculen zoals integrines en de TGF β -receptor. Op deze locatie kan caveoline vele cellulaire processen beïnvloeden die belangrijk zijn in fibrose, zoals de TGF β -signalering, cel-matrix-interactie en de gevoeligheid van cellen voor chemische en mechanische informatie uit de omgeving. Hierdoor lijkt caveoline een centrale plek in te nemen tussen de veranderende extracellulaire matrix tijdens fibrose en de cellen die hiervoor verantwoordelijk zijn.

Op basis van bovenstaande resultaten en informatie uit de literatuur concluderen wij dat er verschillende manieren zijn waarop de eigenschappen van de extracellulaire matrix invloed kunnen uitoefenen op het gedrag van fibroblasten en dus de ontwikkeling van fibrose. De resulterende positieve feedback loop tussen cellen en de matrix kan een belangrijke rol spelen in het progressieve karakter van longfibrose. Dit suggereert dat een therapie gericht op dit niveau van wederkerige cel-matrix-interactie effectiever kan zijn dan traditionele behandelmethodes.