

Nederlandse samenvatting

Het mucosale immuunsysteem

De taak van ons afweersysteem is om ziekmakende bacteriën en virussen die ons lichaam binnendringen, op te ruimen en te verwijderen. In ons maag-darmstelsel wordt dit principe echter veel subtieler toegepast. Hierin leven miljoenen bacteriën, de darmflora. Veel van deze bacteriën zijn niet ziekmakend, maar juist gunstig omdat deze bacteriën noodzakelijk zijn voor de vertering van voedsel dat ons eigen lichaam niet kan afbreken. Echter, wanneer schadelijke bacteriën binnenkomen, kunnen zij infecties veroorzaken. Een goed functionerend afweersysteem in het maag-darmstelsel (vanaf nu het mucosale afweersysteem genoemd) zal dus tegen schadelijke bacteriën in onze darm een afweerreactie opwekken om zo het lichaam te beschermen tegen infecties en ziekten, maar zal tegelijkertijd tolerant zijn voor de onmisbare bacteriën die daar continu aanwezig zijn.

Het mechanisme waarmee ons afweersysteem onderscheid maakt tussen schadelijke en onschadelijke bacteriën is nog niet geheel duidelijk. Toch is het wel duidelijk dat een goede balans van het afweersysteem in de darmen zeer belangrijk is voor onze gezondheid, omdat verstoring van deze balans kan resulteren in chronische darmontstekingen zoals ulceratieve colitis en de ziekte van Crohn. Een beter begrip van deze balans is van groot belang voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor de behandeling van dit soort ziekten.

Vitamine A is zeer belangrijk voor onze gezondheid. Het is essentieel voor veel processen zoals de embryonale ontwikkeling, voortplanting, groei, zicht en het mucosale afweersysteem. Ontoereikende consumptie van voedsel met vitamine A in ontwikkelingslanden resulteert in vitamine A deficiëntie dat voornamelijk voorkomt bij kinderen en zwangere vrouwen. Vitamine A deficiëntie leidt tot o.a. blindheid en groeistoornissen. Vitamine A deficiëntie ook tot een verslechterd afweersysteem waardoor diarree en darmontstekingen verhoogd en in ernstigere vorm voorkomen. Hierdoor overlijden jaarlijks meer dan een miljoen kinderen. Om vitamine A deficiëntie te voorkomen en te verhelpen heeft de Wereldgezondheidsraad programma's opgezet om kinderen in ontwikkelingslanden twee tot drie keer per jaar vitamine A toe te dienen. Dit heeft tot gevolg gehad dat kindersterfte is gedaald met 20-50%. Vitamine A kan niet door ons lichaam geproduceerd worden en is een micronutriënt dat in de darmen wordt geabsorbeerd uit groente, fruit (wortels, pompoen, spinazie, boerenkool), dierlijk voedsel (lever, eieren) en zuivel. Vitamine A wordt in het lichaam omgezet tot retinolzuur. Retinolzuur is de werkzame stof die de hierboven beschreven processen beïnvloeden. Voor de omzetting van vitamine A naar retinolzuur zijn enzymen nodig. Deze enzymen worden retinal dehydrogenase (afgekort RALDH) genoemd.

Dendritische cellen zijn belangrijke cellen van het afweersysteem die in de huid, longen en darmen continu op zoek zijn naar ziekteverwekkers waartegen ons immuunsysteem moet optreden. Wanneer deze zijn waargenomen, dan wordt de informatie over de locatie en type gevaar door dendritische cellen gepresenteerd aan andere cellen van het immuunsysteem die de specifieke afweer moeten leveren. Dit zijn de T- en B-lymfocyten. De plek waar dit met grote efficiëntie gebeurt zijn de lymfoïde organen zoals de lymfeklieren en de milt. Wanneer lymfocyten in deze lymfoïde organen de eiwitten afkomstig van de ziekteverwekkers kunnen herkennen, raken ze geactiveerd, waarna ze in staat zijn om tegen de ziekteverwekkers op te treden.

Wanneer lymfocyten in de darm drainerende lymfeklieren worden geactiveerd krijgen ze vervolgens specifieke eiwitten op hun cel oppervlak, waarmee ze uitermate goed naar de darmen kunnen migreren. Dit is belangrijk omdat hier de ziekteverwekkers zijn binnengedrongen en vervolgens onschadelijk gemaakt moeten worden. Wanneer ziekteverwekkers via de huid binnendringen, dan gaan de lymfocyten die geactiveerd worden in de huid drainerende lymfeklieren juist moleculen tot expressie brengen waardoor ze naar de huid kunnen migreren.

Vitamine A, in de vorm van de biologisch actieve metabool retinolzuur, reguleert de expressie van de moleculen die lymfocyten nodig hebben om naar de darm te migreren, de zogenaamde darmspecifieke homingsreceptoren. De benodigde RALDH enzymen voor de synthese van retinolzuur uit vitamine A worden specifiek door dendritische cellen van de darmen en in de darm drainerende lymfeklieren (mucosale dendritische cellen) tot expressie gebracht, terwijl de dendritische cellen buiten de darm en andere mucosa niet beschikken over deze enzymen.

Naast de inductie van darmspecifieke homingsreceptoren is retinolzuur ook belangrijk voor de productie van het type A antilichamen (IgA). Antilichamen worden door B lymfocyten geproduceerd en

IgA wordt voornamelijk in mucosale weefsels, zoals de darm, geproduceerd om bescherming te bieden tegen de bacteriën die aanwezig zijn in de darm. Retinolzuur is zeer belangrijk voor de productie van IgA door B cellen.

Kort samengevat, vitamine A is zeer belangrijk voor het functioneren van het mucosale afweersysteem, omdat verschillende immunologische processen beïnvloedt worden door de biologische werkzame metaboliet retinolzuur. Toch is er nog veel onbekend over de specifieke mechanismes waarmee vitamine A de gezondheid en het afweersysteem bevordert en de ontwikkeling van infecties verlaagd. In dit proefschrift worden studies beschreven waarin we de rol van vitamine A in verschillende onderdelen van het afweersysteem hebben onderzocht. Onze resultaten dragen bij aan een beter inzicht in de beschermende rol van vitamine A in het mucosale immuunsysteem.

Samenvatting van het proefschrift

In **hoofdstuk 2** laten wij zien dat naast mucosale dendritische cellen ook stromale cellen (of steuncellen) in mesenteriale lymfeklieren RALDH enzymen produceren. Dit betekent dat stromale cellen ook retinolzuur kunnen produceren en T en B lymfocyten kunnen beïnvloeden. Om dit te onderzoeken hebben we mesenteriale lymfeklieren getransplanteerd naar een gebied buiten de mucosa, namelijk de knieholte van de muis. Vervolgens hebben we onderzocht of T cellen in deze lymfeklieren worden gestimuleerd om darmspecifieke eiwitten tot expressie te brengen. De lymfeklier in de knieholte draineert de huid en hier worden normaal gesproken alleen de huidspecifieke homingsreceptoren geïnduceerd op geactiveerde lymfocyten. Na transplantatie verdwijnen de afweercellen uit de getransplanteerde lymfeklier en hiermee dus ook de mucosale RALDH-positieve dendritische cellen. De stromale cellen blijven achter en zijn dan het enige celtype verantwoordelijk voor de productie van retinolzuur. Wanneer lymfocyten in de getransplanteerde mesenteriale lymfeklier worden geactiveerd dan resulteert dit in de expressie van een deel van de darmspecifieke homingsreceptoren, terwijl een ander deel afhankelijk bleek te zijn van de mucosale dendritische cellen. Onze experimenten tonen dus aan dat dendritische cellen en stromale cellen in mesenteriale lymfeklieren beide T cellen kunnen instrueren om darmspecifieke eiwitten tot expressie te brengen en om zo efficiënt mogelijk T cellen naar de juiste weefsels te sturen.

In **hoofdstuk 3** hebben we onderzocht hoe darmepitheelcellen de ontwikkeling van mucosale DCs beïnvloeden. We hebben laten zien dat de darmepitheel cellen de dendritische cellen aanzetten om de vitamine A metaboliserende enzymen RALDH tot expressie te brengen. Deze dendritische cellen stimuleerden vervolgens T cellen om de darm-specifieke homingsreceptoren tot expressie te brengen. Retinolzuur, afkomstig uit de darm epitheel cellen, bleek in dit proces een cruciale factor te zijn. Daarentegen werden dendritische cellen door steuncellen uit de huid juist zo beïnvloed, dat zij lymfocyten stimuleerden om de huid-specifieke homingsreceptoren tot expressie te brengen.

In **hoofdstuk 4** hebben we onderzocht hoe de expressie van RALDH enzymen in dendritische cellen en stromale cellen wordt gereguleerd. Onze resultaten lieten zien dat vlak na de geboorte zowel dendritische cellen als stromale cellen zeer lage expressie van RALDH enzymen vertoonden en dat tijdens de ontwikkeling na de geboorte de expressieniveaus in beiden celtypen verder omhoog gingen. Parallel aan de verhoging van de RALDH expressie vindt na de geboorte ook de bacteriële kolonisatie van de darmen plaats, waarbij allerlei immunologische veranderingen in de darm plaatsvinden. Daarom hebben wij onderzocht of er een verband is tussen bacteriële activatie van dendritische cellen en de inductie van RALDH enzymen. Stimulatie van dendritische cellen in kweekschalen met verschillende bacteriële componenten leidde in een aantal gevallen inderdaad tot het aanzetten van RALDH expressie in de dendritische cellen. Echter, in een levende muis (*in vivo*) lijkt bacteriële signalering minder belangrijk voor de inductie van RALDH enzymen. Dit bleek uit experimenten met mucosale dendritische cellen uit transgene muizen waarin bacteriële signalering is platgelegd. Hierdoor worden de dendritische cellen niet door bacteriën geactiveerd, maar deze vertoonden desondanks nog steeds actieve RALDH enzymen.

Omdat we in hoofdstuk 3 hadden gevonden dat epitheelcellen dendritische cellen kunnen stimuleren om RALDH tot expressie te brengen en dat dit proces afhankelijk was van retinolzuur, hebben wij vervolgens onderzocht of vitamine A de RALDH expressie in dendritische cellen kan beïnvloeden. Om dit te onderzoeken hebben we vitamine A deficiënte muizen gegenereerd door muizen op een vitamine

A-vrij dieet te zetten. Als controle werden ook muizen op diëten met verschillende hoeveelheden vitamine A gegenereerd. Tot onze verbazing vertoonden de mucosale dendritische cellen uit de vitamine A deficiënte muizen helemaal geen RALDH activiteit meer, terwijl deze cellen uit de controle dieren wel beschikten over actieve RALDH enzymen. Dit fenomeen was te herstellen door de vitamine A deficiënte dieren voor een periode van 7 dagen op vitamine A controle voer te zetten. Deze resultaten laten zien dat de expressie van RALDH enzymen in mucosale dendritische cellen volledig afhankelijk is van de aanwezigheid van vitamine A in het voer.

In **hoofdstuk 5** hebben we het vitamine A metabolisme van twee verschillende muizenstammen vergeleken, namelijk BALB/c en C57BL/6 muizen. De BALB/c muizen hadden hogere expressie niveaus van RALDH enzymen in zowel darmen als mesenteriale lymfeklieren. Hierdoor zijn BALB/c muizen in staat zijn om meer retinolzuur te produceren in de darmen en de mesenteriale lymfeklieren dan C57BL/6 muizen. Als gevolg hiervan is de inductie van de darmspecifieke homingsreceptoren hoger in BALB/c muizen in vergelijking met C57BL/6 muizen. De consequentie hiervan is dat er meer lymfocyten aanwezig zijn in de darmen van BALB/c muizen in vergelijking met C57BL/6 muizen. Door de verhoogde retinolzuur productie lijken BALB/c muizen dus te beschikken over een beter functionerend mucosaal afweersysteem dan C57BL/6 muizen.

Dit laatste blijkt ook uit onze colitis studie, welke is beschreven in **hoofdstuk 6**. Hierin hebben we de BALB/c muizen en C57BL/6 muizen opnieuw met elkaar vergeleken in een model waarin colitis werd geïnduceerd. Colitis is een chronische ontsteking van de darmen en wordt in onze muismodellen geïnduceerd door aan drinkwater het stofje dextraan sulfaat sodium (DSS) toe te voegen, waardoor een beschadiging van het darm epitheel ontstaat, welke leidt tot een tijdelijke ontsteking. BALB/c en C57BL/6 muizen verschilden in gevoeligheid voor de ontwikkeling van deze ziekte. Het bleek dat BALB/c muizen een hogere dosis van DSS nodig hadden om een vergelijkbaar ziektebeeld te ontwikkelen als C57BL/6 muizen. Daarnaast herstelden BALB/c muizen sneller van colitis wanneer DSS uit het drinkwater werd verwijderd, zelfs na toediening van de hoge dosis DSS. We toonden aan dat BALB/c muizen tijdens colitis meer lymfoïde structuren in de dikke darm ontwikkelden dan C57BL/6 muizen en dat deze lymfoïde structuren veel IgA producerende B lymfocyten en beschermende T lymfocyten bevatten.

Om te bewijzen dat vitamine A daadwerkelijk belangrijk is voor bescherming tegen colitis hebben we colitis geïnduceerd in vitamine A deficiënte dieren en deze vergeleken met vitamine A controle dieren. Beide groepen ontwikkelden colitis, echter het ziektebeeld in de vitamine A deficiënte dieren was vele malen slechter dan in de vitamine A controle dieren. Deze resultaten tonen aan dat vitamine A een beschermende invloed heeft op colitis en dat een hogere retinolzuurproductie, zoals in BALB/c muizen, correleert met een lagere gevoeligheid voor de ontwikkeling van colitis en dus bijdraagt aan een beter functionerend mucosaal afweersysteem.

In **hoofdstuk 7** van mijn proefschrift wordt besproken hoe retinolzuur de embryonale ontwikkeling van lymfeklieren beïnvloedt. Voor de embryonale ontwikkeling van lymfeklieren zijn lymphoid tissue inducer (LTi) cellen en stromale organizer cellen nodig. Wij toonden *in vitro* aan dat de differentiatie van precursor LTi cellen tot volledig uitgerijpte LTi cellen werd bevorderd door de aanwezigheid van retinolzuur. Wanneer retinolzuur werd toegediend aan het voer van zwangere muizen leidde dit tot de ontwikkeling van meer uitgerijpte LTi cellen in het embryo. Echter, wanneer een zwangere muis op vitamine A deficiënt voer werd gezet, nam het aantal uitgerijpte LTi cellen in het embryo af. Ook in de BALB/c muizen die meer retinolzuur kunnen produceren waren meer uitgerijpte LTi cellen in de embryo's aanwezig dan in C57BL/6 embryo's. Het aantal uitgerijpte LTi cellen correleerde met de grootte van lymfeklieren na de geboorte. Uit deze analyses komt zeer duidelijk naar voren dat BALB/c muizen meer lymfoïde structuren in de darmen hebben en grotere Peyerse platen en mesenteriale lymfeklieren hebben dan C57BL/6 muizen. Dit impliceert dat de vitamine A status (retinolzuurproductie en bloedspiegel) van de moeder invloed kan hebben op de ontwikkeling van het mucosale afweersysteem van haar kind.

Conclusie

De studies beschreven in dit proefschrift laten zien dat vitamine A zeer belangrijk is voor het functioneren van ons mucosale afweersysteem vanwege de positieve invloed van het vitamine A metaboliet retinolzuur op verschillende onderdelen van het mucosale afweersysteem. Onvoldoende

inname van vitamine A kan leiden tot een verstoorde balans van het mucosale afweersysteem wat de ontwikkeling van darmontstekingen en infecties tot gevolg kan hebben. Dit impliceert dat de effectiviteit van het mucosale afweersysteem en de gevoeligheid voor darminfecties en ontstekingen in mensen mede bepaald wordt door de inname en omzetting van vitamine A. Daarom kan de toediening van retinolzuur of mogelijkheid om RALDH niveaus te reguleren in patiënten een effectieve methode zijn om retinolzuur niveaus in de darmen te verhogen en zo het mucosale afweersysteem te versterken tijdens de behandeling van chronische darmontstekingen zoals ulceratieve colitis of de ziekte van Crohn.