

## Nederlandse Samenvatting

### Het ontstekingsproces

Het totaal van reacties op pathofysiologische stimuli, zoals bacteriële en parasitaire infecties, of blootstelling aan irriterende omgevingsfactoren wordt ontsteking of inflammatie genoemd. Het ontstekingsproces wordt gecontroleerd door cytokinen en andere regulerende kleine moleculen, ook wel ontstekingsmediatoren genoemd. Het complexe samenspel tussen ontstekingsmediatoren en cytokinen intergreert tot de ontstekingsreactie. Er bestaan veel verschillende combinaties van cytokinen, mediators en celtypen die allemaal tot ontsteking kunnen leiden.

Alhoewel de ontstekingsreactie bedoeld is om de schadelijke effecten van een externe component te elimineren, of de verspreiding in het lichaam te beperken, kan ontsteking leiden tot excessieve schade wanneer de effecten van de externe component groot is, of wanneer het ontstekingsproces wordt ontregeld. In het geval van sepsis is het niet zo zeer het inducerende pathogeen, maar de geïnduceerde ontstekingsreactie die verantwoordelijk is voor de ernstige gezondheidsproblemen. Allergische reacties zijn voorbeelden van een overdreven immuungemedieerde ontstekingsreactie tegen een onschuldig antigeen, zoals pollen, voedsel of geneesmiddelen. Vergelijkbare mechanismen van immuungemedieerde ontstekingen zijn voor een deel verantwoordelijk voor de pathologische reacties bij auto-immuunziekten.

### Mestcellen

Mestcellen zijn weefselgebonden cellen die zich voornamelijk bevinden op de plaatsen waar contact is met het externe milieu, zoals huid, darm en de long. Mestcellen zijn evolutionair geconserveerde cellen die belangrijke rollen spelen in verschillende immuunreacties, zowel aangeboren als antistofafhankelijke immuunresponsen.

Op basis van de ultrastructuur van de korrels, ook wel granula genoemd, in mestcellen kunnen deze cellen worden onderverdeeld in verschillende subtypen, zoals kristal-bevattende, rol-bevattende en homogeen electrodense granula. De functionele implicaties van deze verschillende typen granula in de mestcellen is niet duidelijk. Oorspronkelijk zijn de granula beschreven als opslagorganel voor de producten van de cel; na stimulatie kunnen de producten snel worden uitgescheiden. Mestcelgranula bevatten vele zeer bioactieve mediators. Naast de bekende mediators zoals histamine, heparine en tryptase wordt een toenemend aantal cytokines beschreven die zijn opgeslagen in de granula van mestcellen, zoals basisch fibroblast groei factor (bFGF), stemcel factor (SCF), vasculair endotheel groei factor (VEGF), interleukine-4 (IL-4) en tumor-necrose factor (TNF).

Mestcellen kunnen bioactieve stoffen uitscheiden zonder volledige degranulatie. Deze vorm van vrijmaken van een deel van de granula verloopt via vesiculair transport en lijkt extra regulatoire checkpoints te bevatten. De signalen die aanzetten tot dit selectieve vesiculaire transport zijn nog niet opgehelderd.

### **Transport van TNF in mestcellen**

Om inzicht te krijgen in de mechanismen bij het transport van TNF in mestcellen is gebruik gemaakt van TNF-EGFP (enhanced green fluorescent protein) fusie-eiwitten die tot expressie werden gebracht in de RBL-2H3 ratte mestcel (Hoofdstuk 2). Wanneer de volledige sequentie van transmembraan TNF werd gekoppeld aan EGFP, trad ophoping in de cytoplasmatische secretoire granula op. De identiteit van de secretoire granula werd vastgesteld middels 3 verschillende, onafhankelijke markers. Na stimulatie van mestcellen werd het TNF-EGFP fusie-eiwit ook efficiënt uitgescheiden. De kinetiek van het verschijnen van de TNF-EGFP in de granula suggereert dat dit via een endoplasmatisch reticulum (ER)/Golgi secretair pad plaatsvindt. Middels het gebruik van selectieve remmers werd dit verder bewezen. Tevens werd zo vastgesteld dat TNF transport naar de granula optreedt vanuit de stadium van late Golgi. Het transport naar de granula wordt gemedieerd via een MPR (mannose-6-phosphate receptor) systeem. Remming van N-linked glycosylering met tunicamycine of mutering van de selectieve site op TNF (N86S) voorkomt transport naar de granula. Dit impliceert dat de granula sortering carbohydraat afhankelijk is en dat MPR's betrokken zijn.

Opmerkelijk is dat in mestcellen van humane origine de carbohydraat-afhankelijk beweging van TNF niet relevant is, omdat het N86 residu niet geconserveerd is en TNF niet is geglycosyleerd (Hoofdstuk 3). Analyse van deletiemutanten van TNF toonden dat residuen 21-46 belangrijk zijn voor binnenkomen in het ER en de daaropvolgende sortering. Opmerkelijk is dat het grootste deel van het cytoplasmatische gedeelte van TNF hierbij niet relevant is. Oppervlakte biotinilering toonde dat TNF transient tot expressie komt op de buitenmembraan en "re-endocyteert" naar de granula en dat dit proces afhankelijk is van het lumenale/extracellulaire gedeelte van het TNF molecuul. Dit laatste zou wijzen op een rol van een interactie tussen een receptor en een accessoir eiwit.

De verschillen in het transport van TNF tussen rat en humane systemen onderschrijven de potentiële zwakke punten van ratmodellen wanneer TNF biologie in mestcellen wordt onderzocht.

### **Regulatie van IL-4 expressie in mestcellen door omgevingsstress.**

Mestcellen spelen een belangrijke rol in het verloop van ontsteking. Mestcellen worden beschouwd als cellen die na activatie een sterk pro-inflammatoir effect hebben. Zeer recent is gebleken dat mestcellen ook een belangrijke rol spelen bij immuuntolerantie en resolutie van ontsteking. Wij hebben onderzoek gedaan aan de regulatie van IL-4 in mestcellen, een belangrijk anti-inflammatoire cytokine.

In diverse pathologische situaties worden mestcellen blootgesteld aan hypoxische condities. Mestcellen dragen bij aan het ontstaan van ontsteking in deze weefsels, onder andere via het vrijmaken van TNF dat wordt vrijgemaakt naar reperfusie. Er is echter een apart, degranulatie-onafhankelijk fase van cytokine productie, waarbij *de novo* synthese en vrijmaking van mediators optreedt. In Hoofdstuk 4 hebben wij aangetoond dat tijdens hypoxie de mestcellen IL-4 (en IL-13) synthetiseren

en vrijmaken, terwijl pro-inflammatoire cytokinen, zoals IL-6, TNF en interferon- $\gamma$  in mestcellen niet toenemen. Opvallend is dat er geen relatie bestaat tussen de hypoxie geïnduceerde productie van IL-4 en de stabilisatie van HIF-1- $\alpha$ , een belangrijke transducer van hypoxie signalering. De regulatie van IL-4 promotor wordt gemedieerd via Akt/GSK-3 en calcineurine routes welke uiteindelijk op het niveau van NFAT samenkomen. NFAT is een belangrijke regulator van IL-4 en IL-13 promotor activiteit in mestcellen. .

Behandeling met kwikionen wordt reeds lange tijd gebruikt in modelsystemen voor systemische autoimmuunziekten, zoals artritis, vasculitis en glomerulonefritis. Kwikion behandeling leidt onder andere tot polyclonale B cell activatie en verhoogde IgE en IL-4 productie. Mestcellen en de IL-4 uit mestcellen lijken een rol te spelen in het ontstaan van deze aandoeningen na kwikionen. Wij hebben onderzocht in Hoofdstuk 5 wat het moleculair mechanisme is voor de kwikgeïnduceerde IL-4 productie door mestcellen. In muize mestcellen hebben wij aangetoond dat de kwikgeïnduceerde IL-4 productie door mestcellen dosis afhankelijk is en additief aan een IgE-antigeen gemedieerde stimulatie. Bij deze IL-4 productie is de P1 NFAT binding plek op de IL-4 promotor relevant. De calcineurine route was relevant in de IL-4 productie, zoals werd aangetoond door middel van experimenten met remmers en analyse van dominant-negatieve mutanten. Tevens bleek dat calcineurine direct door kwikionen wordt geactiveerd.

#### **Algemene conclusies**

Zoals hierboven beschreven worden mestcellen gereguleerd door unieke signaaltransductie routes. Mestcellen zijn weefselgebonden cellen die zich vooral bevinden op de grens tussen organisme en de omgeving. Deze eigenschap in combinatie met het feit dat mestcellen grote hoeveelheden potente bioactieve componenten in hun granula hebben opgeslagen, maakt deze cellen perfecte kandidaten voor de initiëring van immuun-, of niet immuun-gemedieerde reacties op microbiële en parasitaire infecties en expositie aan UV, hypoxia en verontreinigingen in het milieu (zoals kwikionen). Mestcellen initiëren niet alleen de immuunrespons, maar kunnen deze respons ook nog moduleren. Gezien het feit dat mestcellen nu steeds meer worden gezien als cellen met een pro- én anti-inflammatoire functie, moeten mestcellen worden gerespecteerd als belangrijke onderdelen in de immunoregulatie en als therapeutisch doel in de behandeling van ontstekingsaandoeningen en immuundeficienties.