

Alpha and beta glucocorticoid receptor mRNA expression in human bronchial epithelial cells

Citation for published version (APA):

Korn, S. H. (1998). *Alpha and beta glucocorticoid receptor mRNA expression in human bronchial epithelial cells*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.19980219sk>

Document status and date:

Published: 01/01/1998

DOI:

[10.26481/dis.19980219sk](https://doi.org/10.26481/dis.19980219sk)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

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.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

Summary

Despite the central role bronchial epithelial cells play in asthmatic reactions and the widespread use of inhaled corticosteroids in asthma, no information is available about the effect of glucocorticoids on its receptor gene expression in this cell type. Neither are studies performed concerning the α/β glucocorticoid receptor (GR) mRNA ratios, despite the fact that the α GR activity is known to be dominant negatively influenced by the β form, when the latter is excessively present in cells. Therefore, in this thesis the α and β GR mRNA levels and ratios are studied in human bronchial epithelial cells after exposure to the glucocorticoid budesonide.

In **chapter 1**, the introduction, literature of the molecular mechanism behind glucocorticoid action is summarized. It presents an overview of glucocorticoids, the GR and their anti-inflammatory functions. The purpose of the study is outlined and concerns investigation of the α and β GR mRNA expression in bronchial epithelial cells in vitro and in vivo.

Investigation of gene expression in human bronchial epithelium with Northern blot analysis is often impeded by difficulties in collecting enough material. As described in **chapter 2**, modification of an existing method increased the amount of isolated total RNA by 5 times. This modification allows Northern blot analysis of several genes such as the GR. Therefore, the procedure may facilitate the research on diseases of the human bronchial epithelium such as asthma, smoking related diseases and cystic fibrosis.

In **chapter 3** the effect of budesonide on α and β GR gene expression in human bronchial epithelial cells was investigated in vitro and in vivo. Both receptor forms were dose and time dependently downregulated by budesonide in a human bronchial epithelial cell line. The α/β GR mRNA ratios were similar in vitro and in vivo, 2.6 ± 0.7 and 2.3 ± 0.4 , respectively. Great similarity was observed in α and β GR mRNA downregulation between the 1 hour "hit and run" exposure and the in vivo situation. The normalization of the GR mRNA downregulation seen in vivo is explained by the pharmacokinetics of inhaled budesonide in the human lung.

In bronchial epithelial cells of healthy volunteers the GR mRNA expression is regulated in a biphasic way, resulting in an upregulated expression within the first 2 hours, followed, after 2 hours, by a downregulation. In **chapter 4** a side step in our study design was made in an animal model, to better understand the pattern of α and β GR mRNA

downregulation after glucocorticoid use. We observed no change in GR mRNA levels in the rat lungs. Since a clear upregulation of the control glutamine synthetase mRNA took place in the lungs and, in the gastrocnemius a marked downregulation of both α and β GR mRNAs was observed, the lack of response in the lungs was probably due to the diversity in cell population. α/β GR mRNA ratios were higher (2.6 ± 0.6) in the lungs than in the gastrocnemius (1.1 ± 0.2), which supports the hypothesis of a differential gene regulation by glucocorticoids in different cell types.

In patients with asthma the beneficial effects of oral and inhaled glucocorticoids are well established, but their effectiveness in COPD is limited. To determine whether the lack of response of patients with COPD to glucocorticoids is due to a low GR mRNA expression or an α/β GR mRNA ratio below 1, expression levels were compared between patients with COPD using no glucocorticoids and an age-matched control group. In **chapter 5** a lower α GR mRNA expression was observed in the bronchial epithelial cells of patients with COPD compared to an age-matched control group. No difference was observed in α and β GR mRNA ratios between both groups in bronchial epithelial cells and alveolar macrophages. The α/β ratios were 1.6 ± 0.4 in the bronchial epithelial cells and 1.9 ± 0.5 in the alveolar macrophages, suggesting that the limited response to glucocorticoids in patients with COPD can not be explained by α/β GR mRNA ratios below 1.

In bronchial epithelial cells and alveolar macrophages of patients with COPD receiving no glucocorticoids, lower α GR mRNA levels were demonstrated. The aim of **chapter 6** was to investigate the transcriptional response of the GR gene in patients with COPD after glucocorticoid use. In contrast to the non-COPD control patients, no downregulated α and β GR mRNA was observed, indicating a lack of transcriptional response to glucocorticoids in patients with COPD. This could not be explained by deviative GR mRNA levels and/or α/β mRNA ratios, the latter being 1.7 ± 0.4 in patients with COPD and 1.7 ± 0.5 in the controls.

Recent studies have suggested that regular use of β_2 -agonists has adverse effects on asthma control, due to the cross-talk between cAMP response element binding proteins (CREB) and GR. The aim of **chapter 7** was to investigate the interaction between the GR and CREB on cytoplasmic protein level and to determine the effect of this interaction on gene transcription. We conclude that β_2 -agonist exposure interferes with the GR gene regulatory function in human bronchial epithelial cells when given simultaneously. However, this is overcome by exposing cells to glucocorticoids first, followed, after 4

s, by β 2-agonists. The disrupted gene transcription was due to interaction between B and GR within the cytoplasm, as demonstrated by EMSA.

SAMENVATTING

CONSTITUTION

SAMENVATTING

1. Inleiding
2. Doelstelling
3. Methode
4. Resultaten
5. Conclusie
6. Discussie
7. Literatuurverwijzingen
8. Bijlagen
9. Samenvatting

Samenvatting

Ondanks het feit dat de bronchiale epitheelcel een centrale rol speelt in astmatische reacties en inhalatie corticosteroïden veelvuldig gebruikt worden bij astma, is er geen informatie bekend over het effect van glucocorticoiden op de glucocorticoid receptor (GR) genexpressie in dit cel type. Verder zijn er eveneens geen studies uitgevoerd naar de α/β GR mRNA ratio's, ondanks het feit dat de activiteit van de α GR wordt onderdrukt door de β GR, als de laatste in overmaat aanwezig is in cellen. In dit proefschrift zijn α en β GR mRNA niveaus en ratio's bestudeerd in humane bronchiale epitheelcellen na blootstelling aan een glucocorticoid, budesonide.

In **hoofdstuk 1**, de introductie, is een samenvatting gegeven over de literatuur betreffende het moleculair mechanisme van de werking van glucocorticoiden. Glucocorticoiden, de GR en hun anti-inflammatoire werking worden in detail besproken. Het doel van de studie wordt uiteengezet en betreft het bestuderen van de α en β GR mRNA expressie in bronchiale epitheelcellen in vitro en in vivo.

Bestudering van de genexpressie in humane bronchiale epitheliale cellen met Northern blot analyse is vaak onmogelijk in verband met de geringe verzameling van materiaal. In **hoofdstuk 2** is beschreven hoe de hoeveelheid geïsoleerd totaal RNA met 5 keer is vermenigvuldigd. Dit is verkregen door modificatie van een bestaande RNA isolatie methode. Deze modificatie kan mogelijk het onderzoek naar ziektes met betrekking tot het bronchiale epitheel, zoals astma, ziektes gerelateerd aan roken en cystische fibrose enigszins bespoedigen.

In **hoofdstuk 3** is het effect van budesonide op de α en β GR mRNA expressie in humane bronchiale epitheelcellen bestudeerd in vitro en in vivo. Beide receptorvormen werden dosis- en tijdsafhankelijk verlaagd in hun mRNA expressie. De α/β GR mRNA ratio's waren vrijwel hetzelfde in vitro en in vivo. Er bestond een zeer grote gelijkheid tussen het GR mRNA patroon na de 1 uur "hit and run" blootstelling en de in vivo resultaten. Normalisatie van de GR mRNA verlaging geobserveerd in vivo wordt verklaard door de farmacokinetiek van geïnhaled budesonide in de humane long.

De GR mRNA expressie in humane bronchiale epitheelcellen wordt op een bifasische manier door budesonide gereguleerd. Eerst is een geringe stijging waar te nemen, die 2 later gevolgd wordt door een daling. Om dit korte termijn patroon beter te bestuderen, is in **hoofdstuk 4** een rattenmodel onderzocht, waarbij geen verandering in GR mRNA

expressie in de longen na blootstelling aan budesonide waargenomen werd. Aangezien er wel een duidelijk effect op de glutaminesynthetase gen regulatie waarneembaar was in de longen en er een verlaging van de GR mRNA optrad in de gastrocnemius spier, wordt verondersteld dat de afwezigheid van respons in de longen het gevolg is van de diversiteit van de celpopulatie. Interessant is dat α/β GR ratio's hoger waren in de longen (2.6 ± 0.6) vergeleken met die in de gastrocnemius spier (1.1 ± 0.2). Dit ondersteunt de hypothese dat verschillende celtypen verschillend gereguleerd worden op gen transcriptioneel niveau door glucocorticoïden.

Bij patiënten met astma is de positieve werking van glucocorticoïden algemeen bekend. Echter, bij patiënten met COPD is het nuttig effect twijfelachtig. Om te bepalen of het gebrek aan respons op glucocorticoïden bij patiënten met COPD veroorzaakt wordt door lage GR mRNA niveaus of een α/β GR mRNA ratio beneden de 1, zijn patiënten met COPD vergeleken met een leeftijdsovereenkomstige controle groep. De patiënten in beide groepen gebruikten geen glucocorticoïden. In **hoofdstuk 5** is een lagere expressie waargenomen van de α GR mRNA niveaus in de bronchiale epitheel cellen van patiënten met COPD. Er bleek geen verschil in α en β GR mRNA ratio's tussen beide groepen in bronchiale epitheelcellen en alveolaire macrofagen. De α/β GR mRNA ratio's in de bronchiale epitheelcellen en alveolaire macrofagen waren rond de 1.7. Dit suggereert dat de beperkte respons van patiënten met COPD niet veroorzaakt wordt door een α/β ratio beneden de 1 of afwijkende GR mRNA niveaus.

In bronchiale epitheelcellen van patiënten met COPD die geen glucocorticoïden gebruiken zijn geen abnormale α en β GR mRNA niveaus en ratio's gevonden. Het doel van **hoofdstuk 6** is het bestuderen van de α en β GR mRNA niveaus en ratio's in patiënten met COPD na glucocorticoïd gebruik. In tegenstelling tot niet-COPD controle patiënten, is er bij patiënten met COPD geen respons op gen niveau te zien na gebruik van glucocorticoïden. Dit kon echter niet verklaard worden door afwijkende α en β GR mRNA niveaus en ratio's. Deze laatste waren 1.7 ± 0.4 in patiënten met COPD en 1.7 ± 0.5 in de controle groep.

Recente studies suggereren dat regelmatig gebruik van β_2 -agonisten een tegengesteld effect heeft op het onder controle houden van astma. Als oorzaak wordt een interactie tussen cAMP 'responsive element binding proteins' (CREB) en de GR gegeven. Het doel van **hoofdstuk 7** is deze interactie op cytoplasmatisch niveau te bestuderen en te bepalen of deze interactie gevolgen heeft voor de gentranscriptie. Geconcludeerd werd dat β_2 -agonist blootstelling van bronchiale epitheelcellen interfereert met de GR gereguleerde

gen transcriptie als beide medicijnen gelijktijdig worden toegediend. Dit kan voorkomen worden door eerst glucocorticoïden toe te dienen en na enige tijd β_2 -agonisten. De verstoorde gen transcriptie is veroorzaakt door een interactie tussen CREB en GR, aangetoond met de EMSA analyse.

Samenvatting

De tekst is extreem licht en onleesbaar. Het lijkt te gaan over een samenvatting van een document, maar de inhoud is niet te onderscheiden. Het kan gaan om een lijst van punten of een korte beschrijving van een proces. De structuur is mogelijk opgebouwd uit alinea's of opsommingen, maar dit is niet te bevestigen op basis van de huidige afbeelding.