

Redox regulation in pulmonary fibrosis

Citation for published version (APA):

Veith, C. (2019). *Redox regulation in pulmonary fibrosis: towards therapeutic targets*. Gildeprint Drukkerijen. <https://doi.org/10.26481/dis.20190524cv>

Document status and date:

Published: 01/01/2019

DOI:

[10.26481/dis.20190524cv](https://doi.org/10.26481/dis.20190524cv)

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.

Samenvatting

Idiopathische longfibrose (IPF) is een chronische longziekte met een gemiddelde levensverwachting van slechts drie jaar na diagnose. Longfibrose wordt gekarakteriseerd door de vorming van littekenweefsel in de longen dat tot zogeheten long falen leidt. In Nederland wordt bij gemiddeld 1000 mensen per jaar longfibrose ontdekt. De ziekte wordt gekenmerkt door een overproductie van schadelijke reactieve zuurstof radicalen (RZS) en verhoogde markers van oxidatieve schade zijn aangetoond in de longen van IPF patiënten. Desondanks zijn antioxidant-therapieën niet bewezen effectief bij de behandeling van IPF en de rol van oxidatieve stress in de ontwikkeling van de ziekte is nog steeds niet helemaal duidelijk. **Het doel van dit proefschrift was om het belang van oxidant regulatie bij pulmonale fibrose te onderzoeken.** Hiertoe werd 1) de rol van RZS bestudeerd door RZS weg te vangen met het antioxidant quercetine, 2) de rol van RZS geproduceerd door het enzym NADPH-oxidase NOX4 bij de activatie van SRC kinasen onderzocht en 3) het effect van SRC kinasen (SK) inhibitie om specifieke kenmerken van IPF te verminderen geëvalueerd.

Hoofdstuk 2 omvat een literatuuroverzicht over oxidant regulatie in longfibrose. IPF wordt gekenmerkt door terugkerende beschadigingen van de epitheliale long cellen die resulteren in afwijkende wondgenezingreacties en uiteindelijk tot overmatige afzetting van collageen in de long. In dit hoofdstuk is de huidige kennis met betrekking tot verschillende aspecten van RZS-disbalans in de ontwikkeling van IPF samengevat. Speciale nadruk is gelegd op het belang van disregulatie van NOX-activering, mitochondriale disfunctie en de communicatie tussen NOX4 en mitochondriën. Wij concluderen dat selectieve remming van specifieke NOX-isovormen aangrijpingspunt kan zijn voor de behandeling van IPF. Deze conclusie is met name relevant in het licht van recente studies die aantonen dat redoxveranderingen geïnduceerd kunnen worden door mitochondriale interacties met NOX enzymen.

In **Hoofdstuk 3** hebben we de mogelijk beschermende effecten van het antioxidant quercetine op oxidant productie en pro-inflammatoire cytokine secretie in humane bronchiale epitheel cellen en *ex vivo* in het bloed van IPF patiënten onderzocht. Quercetine verlaagde de door bleomycine-geïnduceerde RZS-productie, terwijl dit antioxidant een verhoging veroorzaakte van de Nrf2 activiteit en de afgifte van inflammatoire cytokines *in vitro* en *ex vivo* in het bloed van IPF patiënten werd verminderd. Eén week met quercetine suppletie bij muizen verhoogde concentratie van quercetine in het bloedplasma, maar niet in de longen, en verhoogde enigszins de pulmonale expressie van Nrf2-responsieve genen (**hoofdstuk 4**). Na blootstelling aan bleomycine vertoonden quercetine gevoede wildtype muizen verminderde expressie van collageen en fibronectine evenals verminderde pulmonaire inflammatoire laesies. Bovendien verminderde quercetine de pulmonaire genexpressie van TNF α en KC, maar niet hun plasma levels, en verminderde malondialdehyde-dG DNA-adducten in de long. In

Nrf2 knockout dieren werd geen verbetering van quercetine op ontstekingslaesies in de long waargenomen bij blootstelling aan bleomycine, dat suggereert dat quercetine beschermt tegen bleomycine-geïnduceerde longschade in de wildtype muizen biedt via Nrf2. Quercetine suppletie kon de bleomycine-geïnduceerde schade echter niet volledig ongedaan maken, hetgeen erop wijst dat quercetine toevoeging aan het dieet niet voldoende is om de ontwikkeling van pulmonaire fibrose tegen te gaan.

Een belangrijke bron van RZS in de longen is het enzym NADPH-oxidase (NOX) 4. De eiwitten die door de RZS geproduceerd door NOX4 worden gemodificeerd zijn grotendeels nog onbekend alsook het effect hiervan. In **hoofdstuk 5** is de reactie van TGF- β 1 op humane bronchiale epitheelcellen bestudeerd en het bleek dat NOX4 het SFK-familieelid FYN oxideerde en daardoor activeerde. Deze activatie leidt tot een verhoogde RZS production, fibrotische gene expressie en DNA schade. Wanneer FYN werd geremd door de farmacologische remmer PP2 of door het gebruik van siRNA, verminderde het de mitochondriale RZS-productie, wat leidde tot vermindering van DNA-schade en expressie van fibronectine. Inhibitie van SFK door de farmacologische remmer saracatinib verminderde de activatie van fibroblasten en de productie van RZS-en inflammatoire cytokines door deze cellen, zoals gepresenteerd in **hoofdstuk 6**. Opvallend is dat TGF- β 1 blootstelling in fibroblasten een ander SFK-familieelid, te weten YES, activeerde dat bijdroeg aan de expressie van extracellulaire matrixgenen. Verder was de TGF-geïnduceerde toename in NOX4-expressie verminderd in cellen waarin YES was geblokkeerd. Deze observatie geeft aan dat SFK-familieelid fibroblasten activatie bevordert, vermoedelijk via inductie van NOX4.

In **hoofdstuk 7** hebben we aangetoond dat bronchiale epitheelcellen van IPF-patiënten een verhoogde activatie van SFK vertonen. Remming van deze SFK door saracatinib verlaagde markers van mitochondriale dysfunctie door het verhogen van de expressie van genen geassocieerd met mitochondriale biogenese en mitofagie. Bovendien verminderde SFK remming de afgifte van LDH, wat wijst op celbeschadiging, en de genexpressie van het pro-apoptotische BAX alsook het enzym NOX4. In gedifferentieerde bronchiale epitheelcellen van IPF-patiënten was de expressie van NOX4 licht verhoogd in vergelijking met epitheelcellen van controles, maar deze verschillen op individueel niveau (**hoofdstuk 8**). Op dit moment zijn er geen volledig effectieve behandelingsmogelijkheden voor IPF. Er zijn wel twee medicijnen die de achteruitgang van de ziekte kunnen remmen, te weten pirfenidone en nintedanib, maar deze werken niet bij alle patiënten. Een intrigerende bevinding was dat bij patiënten die een hogere NOX4-expressie hadden in hun epitheelcellen, pirfenidon een verhoogde expressie van antioxidant genen induceerde. Een andere interessante vondst was de significante verhoging van het pro-inflammatoire IL-8 in bronchiale epitheel cellen afkomstig van IPF patiënten die significant verlaagd werd doorbehandeling met de farmacologische SFK remmer saracatinib. Na vergelijking van de

effecten van de reguliere IPF geneesmiddelen pirfenidon en nintedanib met die van de SFK remmer saracatinib in gedifferentieerde bronchiale epitheelcellen van IPF patiënten stellen we voor dat deze patiënten zouden kunnen profiteren van een gepersonaliseerde behandeling. Deze aanbeveling is gebaseerd op de bevinding dat de respons op de verschillende geneesmiddelen sterk varieerde tussen individuele patiënten en afhankelijk was van onder meer hun redox en inflammatoire status.

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift (**hoofdstuk 9**) worden de belangrijkste bevindingen samengevat en besproken. Concluderend kan er gesteld worden dat dit proefschrift bijdraagt aan meerbegrip van redox-regulatie in long fibrose. Onze bevindingen geven aan dat modulatie van redox-gevoelige eiwitten zoals de SRC kinasen nieuwe aanwijzingen kan geven voor de behandeling van patiënten met IPF. Bovendien geven onze resultaten aan dat er meer aandacht moet worden besteed aan gepersonaliseerde behandeling. Dit past bij het beeld dat IPF een erg heterogene ziekte is waarbij één medicijn voor iedereen niet afdoende zal zijn om de hoge sterfte als gevolg van deze ziekte te verminderen. Om deze volgende stap te bereiken hebben we stratificatie van patiëntensubgroepen nodig als ook specifieke markers om vervolgens de therapieresultaten in deze verschillende groepen te voorspellen en op te volgen. Omdat algemeen voorspellende biomarkers moeilijk te verkrijgen zijn voor een dergelijke heterogene ziekte, zijn alternatieve benaderingen nodig. Een dergelijke benadering zou het testen van verschillende geneesmiddelen op bronchiale epitheelcellen van IPF patiënten zijn., verkegen tijdens bronchoscopie, zodat vóór aanvang van de therapie de uitkomst van de behandeling geoptimaliseerd kan worden.

Zusammenfassung

Idiopathische Lungenfibrose (IPF) ist eine chronische Lungenerkrankung mit einer Lebenserwartung von nur drei Jahren nach der Diagnose. In den Niederlanden wird eine Lungenfibrose bei durchschnittlich 1.000 Menschen pro Jahr diagnostiziert. Wissenschaftler haben herausgefunden, dass Lungenfibrose durch eine Schädigung der Epithelzellen in der Lunge entsteht. Diese Schädigung sorgt für eine vermehrte Freisetzung von Entzündungsmediatoren und der Bildung von Bindegewebe durch Fibroblasten, was die Sauerstoffaufnahme zwischen den Lungenbläschen ins Blut erschwert. Diese Narbenbildung in der Lunge führt langfristig zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion und letztendlich zu Lungenversagen. Dieser Prozess ist durch eine Überproduktion von schädlichen freien Sauerstoffradikalen gekennzeichnet und IPF-Patienten weisen erhöhte Marker für oxidative Schäden in der Lunge auf. Reaktive Sauerstoffradikale entstehen in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung, werden aber auch von speziellen Enzymen im Körper, den sogenannten NADPH Oxidasen (NOX), produziert. Sauerstoffradikale regulieren wichtige Prozesse im Körper, können jedoch in zu hohen Konzentrationen die Zelle schädigen und zu „oxidativem Stress“ führen. Deshalb haben Antioxidantien eine große Bedeutung als Radikalfänger in der Lunge und regulieren die Konzentration von Sauerstoffradikalen. Trotz der Schlüsselrolle von Sauerstoffradikalen haben sich Therapien mit Antioxidantien bei der Behandlung von IPF nicht als wirksam erwiesen. Das hängt damit zusammen, dass die Rolle von oxidativem Stress bei der Entstehung der Krankheit noch nicht klar definiert und die Regulierung von Sauerstoffradikalen sehr schwierig ist, da sie im Körper auch eine wichtige Rolle als Signalmoleküle einnehmen.

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die Bedeutung von Sauerstoffradikalen bei der Entstehung von Lungenfibrose genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wird 1) die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in einem Zell- und Mäusemodell für Lungenfibrose bestimmt, indem ROS mit dem Antioxidanten Quercetin neutralisiert wird. 2) Danach wird die Rolle von Sauerstoffradikalen, die spezifisch durch die NADPH-Oxidase NOX4 entstehen, und deren Rolle bei der Aktivierung von SRC-Kinasen in einem Zellmodell untersucht. 3) Die Rolle von SRC-Kinasen Inhibitoren wird ausgewertet, um spezifische Merkmale von IPF in primären Zellen von IPF-Patienten zu reduzieren.

Wie in **Kapitel 2** beschrieben, zeichnet sich IPF durch eine wiederkehrende Verletzung der Lungen-Epithelzellen aus, die zu einer abnormalen Wundheilungsreaktionen führt und schließlich eine übermäßige Bindegewebeablagerung in der Lunge bewirkt. Darüber hinaus wird das aktuelle Wissen in Bezug auf die verschiedenen Aspekte des ROS-Ungleichgewichts in Zusammenhang mit IPF und den potentiellen Rollen bei der Krankheitsentwicklung zusammengefasst. Der Schwerpunkt dieser Literaturübersicht liegt jedoch auf der Bedeutung von unangemessener NOX-Aktivierung, dem Effekt von einer mitochondrialen Dysfunktion und der Rolle von Oxidantienkommunikation zwischen NOX4

und den Mitochondrien. Insgesamt deuten viele Studien darauf hin, dass das selektive Targeting spezifischer NOX-Isoformen und/oder die Produktion von mitochondrialen ROS für die Bekämpfung von IPF vorteilhaft sein können.

In **Kapitel 3** werden die möglichen schützenden Wirkungen des Antioxidanten Quercetin auf die Produktion von Sauerstoffradikalen und Entzündungsmediatoren in humanen bronchialen Epithelzellen und im Blut von IPF-Patienten untersucht. Quercetin gehört zur Familie der Polyphenole und Flavaniode, welche in hohen Konzentrationen in Obst und Gemüse gefunden werden können. In Zellen reduziert Quercetin die durch Bleomycin, ein häufig genutztes Modell für die Initiierung von Fibrose, induzierte ROS-Produktion und erhöht gleichzeitig die Nrf2-Aktivität. Nrf2 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der durch ROS sowie durch Quercetin aktiviert wird. Diese Aktivierung fördert die Abschreibung von Genen die zur Synthese von Enzymen, welche ROS neutralisieren, beitragen und daher auch ROS-induzierte Zellschäden reduzieren. Quercetin verringert auch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in den Zellen und im Blut von IPF-Patienten. **Kapitel 4** beschreibt den Effekt von Quercetin in einem Bleomycin-induzierten Fibrose-Modell in Mäusen. Eine Woche nach der Quercetin-Einnahme durch die Nahrung erhöht sich die Quercetinkonzentration im Plasma, nicht aber in der Lunge, und die pulmonale Expression von Nrf2-abhängigen Genen erhöht sich (**Kapitel 4**). In wildtype Nrf2 Quercetin-gefütterten Mäusen zeigt sich eine verminderte Expression von Bindegewebe-proteinen und es verringert entzündliche Läsionen in der Lunge. Zudem reduziert Quercetin die pulmonale Genexpression der Entzündungsproteine TNF α und KC, nicht jedoch deren Plasmakonzentration, und reduziert Malondialdehyd-dG-DNA-Addukte (oxidative DNA-Schädigung). Bei Mäusen ohne funktionierendem Nrf2 wird bei Einwirkung von Bleomycin kein positiver Effekt von Quercetin auf die entzündlichen Lungenläsionen beobachtet, was darauf schließen lässt, dass Quercetin durch die Induktion von Nrf2 vor Bleomycin-induzierten Lungenschäden schützt. Die Quercetin-Supplementierung kann jedoch die durch Bleomycin verursachten Schäden nicht erheblich reduzieren, was darauf hindeutet, dass Quercetin nicht ausreicht, um die Entwicklung einer Lungenfibrose zu verhindern.

Die NADPH-Oxidase NOX4 ist eine wichtige Quelle für reaktive Sauerstoffradikale in der Lunge. Unter den NADPH-Oxidasen ist NOX4 einzigartig, da diese konstitutiv aktiv ist und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) produziert. NOX4 hat einen großen Einfluss auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen und kann die Aktivität von Proteinen durch deren Oxidation beeinflussen. Jedoch sind Proteine, die durch NOX4 modifiziert werden können, weitgehend unbekannt. In **Kapitel 5** wird erläutert, dass NOX4 das SRC-Kinase Mitglied FYN oxidiert und dadurch aktiviert in humanen bronchialen Epithelzellen. Die SRC-Familie der Tyrosinkinase sind Proteine, deren Aktivität hauptsächlich durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden. Diese Aktivierung von SRC-Kinasen spielt eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion. Wissenschaftler haben

herausgefunden, dass die Deaktivierung von SRC-Kinasen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Lungenfibrose spielt, es ist jedoch nicht bekannt wie sie dazu beitragen. Wenn FYN inhibiert wird, reduziert es die ROS-Produktion durch die Mitochondrien, was auch zu einer Verringerung von oxidativem DNA-Schaden und Expression von Bindegewebe Proteinen führt. Der SRC-Inhibitor Saracatinib verringert die Aktivierung von Fibroblasten, die ROS-Produktion sowie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie in **Kapitel 6** dargestellt wird. Interessanterweise aktiviert TGF- β 1 das SFK-Mitglied YES in Fibroblasten, was zur Expression von Bindegewebe Proteinen in Fibroblasten beiträgt. Darüber hinaus ist der TGF-induzierte Anstieg der NOX4-Expression in YES-negativen Zellen reduziert, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung von YES in Fibroblasten potentiell für die Induktion von NOX4 verantwortlich ist.

In **Kapitel 7** wird gezeigt, dass bronchiale Epithelzellen von IPF-Patienten eine erhöhte Aktivierung von SRC-Kinasen aufweisen. Die Hemmung dieser Kinasen mit dem Inhibitor Saracatinib, reduziert Markers der mitochondrialen Dysfunktion, indem die Expression von Genen verstärkt wird, die mit der mitochondrialen Biogenese und Mitophagie assoziiert sind. Darüber hinaus verringert die SFK-Hemmung die Freisetzung von LDH, was auf eine Zellschädigung hinweist, und die Expression des pro-apoptischen Gens BAX sowie das ROS-produzierende Enzym NOX4. In differenzierten bronchialen Epithelzellen ist die Expression von NOX4 bei IPF-Patienten im Vergleich zu Epithelzellen von Kontroll-Patienten leicht erhöht, unterscheidet sich jedoch erheblich zwischen individuellen IPF-Patienten (**Kapitel 8**). Derzeit gibt es keine voll wirksamen Behandlungsmöglichkeiten für IPF. Es gibt zwei Medikamente, die der Verschlechterung der Erkrankung entgegenwirken: Pirfenidon und Nintedanib. Diese wirken jedoch nicht bei allen Patienten. Interessanterweise induziert Pirfenidon bei Patienten mit höherer NOX4-Expression die Expression von antioxidanten Genen. Zusätzlich ist der Entzündungsmediator IL-8 in HBE-Zellen von IPF-Patienten signifikant erhöht und die Behandlung mit Saracatinib reduziert diese erhöhte IL-8-Sekretion. Nachdem die Wirkungen der zugelassenen Arzneimittel Pirfenidon und Nintedanib mit dem SFK-Inhibitor Saracatinib in differenzierten bronchialen Epithelzellen verglichen wurden, wird eine personalisierte Behandlung von IPF-Patienten empfohlen, da die Reaktion auf verschiedene Arzneimittel zwischen IPF Patienten sehr unterschiedlich ist und zusätzlich von ihrem Redox- und Entzündungsstatus abhängt.

Im letzten Kapitel dieser Arbeit (**Kapitel 9**) werden die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst und diskutiert. Zusammenfassend trägt diese Arbeit zum Verständnis der Bedeutung von Redoxregulation bei der Entstehung von Lungenfibrose bei. Die Ergebnisse zeigen, dass die Modulation von Redox-empfindlichen Proteinen, wie den SRC-Kinasen, neue Hinweise für die Behandlung von Patienten mit IPF liefern kann. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass mehr Arbeit an der

personalisierten Behandlung geleistet werden muss. Da IPF eine sehr heterogene Krankheit ist, werden neue Therapiemethoden benötigt, die speziell auf die Patienten angepasst werden. Um diesen nächsten Schritt zu erreichen, wird eine Stratifizierung von Patienten-Subgruppen und -Markern benötigt, um die Therapieergebnisse in diesen verschiedenen Gruppen besser vorherzusagen. Da Biomarker für solch eine heterogene Erkrankung nur schwer zu erhalten sind, besteht ein alternativer Ansatz darin, verschiedene Arzneimittel vor dem Behandlungsbeginn an bronchialen Epithelzellen von Patienten zu testen, um die individuelle Therapie für die Patienten zu verbessern und die hohe Sterblichkeit einzudämmen.