

Rozdział 6A – Streszczenie.

Komórki nabłonka dolnych dróg oddechowych stanowią pierwszą linię obrony przed czynnikami środowiskowymi, takimi jak: alergeny oraz czynniki infekcyjne. Dzięki ścisłemu przyleganiu oraz wytwarzanemu śluzowi budują naturalną barierę biologiczną uniemożliwiającą wniknięcie czynników infekcyjnych do organizmu. Funkcja ta związana jest bezpośrednio obecnością białek tworzących tzw. ścisłe połączenia międzykomórkowe (*ang. tight junctions*). W ich skład wchodzi białka występujące bezpośrednio pomiędzy sąsiadującymi komórkami nabłonkowymi (np. okludyna, *ang. occludin*; kładyny *ang. claudins*, junctional adhesion molecules (JAMs)) oraz białka odpowiedzialne za wzrost, różnicowanie i procesy transkrypcyjne znajdujące się wewnątrz komórki (np. *ang. zonula occludens*). Zaburzenia funkcjonowania bariery nabłonka dróg oddechowych prowadzą do rozwoju chorób zapalnych takich jak astma, atopowe zapalenie skóry i chroniczny nieżyt nosa. Niestety, funkcja białek odpowiedzialnych za ścisłe przyleganie komórek nabłonkowych w patogenezie astmy nie została w wystarczający sposób poznana i opisana. Dlatego celem niniejszej pracy była ocena nowych mechanizmów regulujących ekspresję i funkcję połączeń ścisłych bariery epitelialnej nabłonka dolnych dróg oddechowych w astmie. Materiał badawczy stanowiły komórki nabłonka dolnych dróg oddechowych pobrane od 18 chorych z astmą w tym 11 chorych z nadwrażliwością na kwas acetylosalicylowy lub inny niesteroidowy lek przeciw zapalny (tzw. astma indukowana aspiryną) oraz 8 osób z grupy kontrolnej (niebędących astmatykami). Komórki nabłonka dolnych dróg oddechowych, hodowane były *in vitro* w układzie umożliwiającym ich funkcjonalne różnicowanie. W tym celu zastosowana została hodowla na pograniczu fazy ciekłej i gazowej (*ang. air-liquid interface*; ALI). W zróżnicowanych komórkach (pomiędzy 21 a 28 dniem hodowli) został wykonany pomiar integralności (*ang. trans epithelial electric resistance* (TER)). Następnie, komórki nabłonkowe wystawione zostały na działanie limfocytów T efektorowych typu 2 lub hodowane były w obecności cytokin charakterystycznych dla profilu Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-33, TSLP) i/lub inhibitora deacetylaz histonowych nowej generacji (JNJ-26481585). Ocena integralności komórek dokonana została w oparciu o ocenę oporności elektrycznej oraz przepływu fluorescencyjnie znakowanego dextranu. Ocena międzykomórkowych połączeń ścisłych i aktywności deacetylaz histonowych wykonana została w oparciu o analizę ekspresji genów na poziomie RNA (qPCR) oraz białka (WB, mikroskopia konfokalna). 63

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano spadek integralności bariery komórek nabłonka dolnych dróg oddechowych u pacjentów z astmą. Komórki pochodzące od pacjentów z grupy kontrolnej hodowane w obecności limfocytów Th2 lub IL-4 i IL-13 cechowały się obniżoną zdolnością do ścisłego przylegania. Zaobserwowano wzrost ekspresji genów deacetylaz histonowych typu 1 i 9. Dodatkowo stymulacja IL-4 oraz IL-13 powodowała wzrost ekspresji opisywanych białek w komórkach pochodzących od pacjentów z astmą i od pacjentów z grupy kontrolnej. Komórki pacjentów z astmą cechowały się podwyższoną aktywnością analizowanych deacetylaz histonowych. Wykazano również istotny wpływ inhibitora deacetylaz histonowych na zwiększenie integralności komórek nabłonka dolnych dróg oddechowych pochodzących od pacjentów z astmą, co potencjalnie może służyć identyfikacji nowych celów w terapii astmy.

Rozdział 6B – Abstract

Airway epithelium represents first line of defence against environmental factors including invading pathogens, pollutants and allergens. Epithelial cells form natural barrier through several types of cell-to-cell adhesion complexes build by tight junction proteins. These molecules are responsible for direct tight adherence of neighbouring cells (occludin, claudins, junctional adhesion molecules) and control of cell growth, differentiation and gene transcription processes (zonula occludens). Notably, disruption of airway epithelial barrier function leads to development of inflammatory diseases including asthma, atopic dermatitis and chronic rhinitis. Unfortunately, to date function of tight junction proteins in bronchial epithelial cells in pathogenesis of asthma has not been fully elucidated. Therefore, the purpose of this study was to investigate novel mechanisms involved in regulation of epithelial barrier function in asthma.

Bronchial epithelial cells from 18 asthmatic (including 11 patients with aspirin induced asthma) and 8 non-asthmatic (control) individuals were collected and cultured in air-liquid interface (ALI) system. Notably, ALI cultures allow bronchial epithelial cells to undergo extensive mucociliary differentiation similar to in vivo airway epithelium. Integrity of differentiated bronchial epithelial cells (between 21-28 day of ALI culture) was measured by using transepithelial electric resistance (TER). Next, bronchial epithelial cells were cultured in presence of Th2 effector cells or Th2 related cytokines (IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-33 and TSLP) and/or treated with new generation histone deacetylases (HDACs) inhibitor (JNJ-26481585). Finally, epithelial barrier integrity was assessed by TER measurement and 64

paracellular flux (by using FITC-labelled dextran), while expression of TJ proteins and HDACs in bronchial epithelial cells were evaluated by qPCR, western blot and confocal staining. Bronchial epithelial cells from asthmatic patients showed significantly decreased baseline integrity when compared to controls. However, the latter cells showed decreased integrity in presence of Th2 effector cells or Th2 related cytokines, namely IL-4 and IL-13. Furthermore, cells from asthmatic individuals showed upregulated baseline expression of HDAC1 and HDAC9 when compared to controls. Importantly, IL-4 and IL-13 signalling in bronchial epithelial cells increased expression of analysed HDACs. Moreover, HDAC activity in bronchial epithelial cells from asthmatic patients was significantly increased when compared to controls. Interestingly, inhibition of HDACs activity in bronchial epithelial cells improved their integrity. Therefore, use of new generation HDAC inhibitors may become a novel therapeutic strategy to treat asthma.