

University of Groningen

A human in vitro model for airway neuro-effector interactions

Goldsteen, Pien

DOI:
[10.33612/diss.240039804](https://doi.org/10.33612/diss.240039804)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2022

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Goldsteen, P. (2022). *A human in vitro model for airway neuro-effector interactions*. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.240039804>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



Appendix

Dutch summary / Nederlandse samenvatting
Acknowledgements / Dankwoord
Curriculum vitae
List of publications

Nederlandse samenvatting

Inleiding

Wereldwijd hebben meer dan 399 miljoen mensen last van astma. Astma is een longziekte die wordt gekenmerkt door chronische ontstekingen, vaak in combinatie met een heftige reactie van het immuunsysteem op onschuldige indringers als huisstofmijt of graspollen. Dit resulteert in kortademigheid, een piepende ademhaling, druk op de borst en/of hoesten. Er liggen een aantal pathofysiologische aspecten ten grondslag aan astma: chronische ontstekingen, maar ook een verandering in de grootte, functie en samenstelling van longcellen. De ontstekingsreactie wordt vaak veroorzaakt door een hoge productie van signaalstoffen, om precies te zijn type 2 cytokines: interleukine-4 (IL-4), IL-5 en IL-13. Deze signaalstoffen zorgen op hun beurt voor het aantrekken van witte bloedcellen, zoals eosinofielen. Door de constante kleine luchtweginfecties neemt de kans op het terugkomen van astma-aanvallen toe.

Daarnaast zijn er cellen die een grote rol spelen in luchtwegvernauwing, zoals luchtweg gladde spiercellen. De grotere luchtwegen bevatten veel van deze spiercellen, en het samentrekken van deze spiercellen zorgt voor de luchtwegvernauwing. Luchtweg gladde spiercellen zijn bij astmapatiënten onderhevig aan veranderingen: er zijn meer gladde spiercellen aanwezig in de luchtwegen, en de aanwezige cellen zijn ook nog eens groter. Dit draagt bij aan de benauwdheid en kortademigheid die astmapatiënten regelmatig ervaren. De gladde spiercellen worden aangestuurd door het zenuwstelsel om zich samen te trekken (Figuur 1, links). Het zenuwstelsel in de longen is de drijvende kracht achter een normale longfunctie, en reguleert de ademhaling, luchtwegopening en -vernauwing, slijmproductie en hoesten. De rol van het zenuwstelsel is dus groot. Het zenuwstelsel is, net als de gladde spiercellen, onderhevig aan verandering bij astmapatiënten. Er zijn meer zenuwuitlopers zichtbaar in de longen van astmapatiënten, met name in patiënten met ernstig astma. Dit heet "*neuronale remodeling*", en is het geval voor zowel sensorische zenuwen als voor parasympatische zenuwen. Het zijn de parasympatische zenuwen die de gladde spiercellen aanzetten tot samentrekken. Men kan zich voorstellen dat meer zenuwuitlopers betekent dat er meer signalen uitgaan naar de spieren – die ook al groter zijn – om zich samen te trekken, wat een dubbel versterkend effect heeft op luchtwegvernauwing. Het is belangrijk meer te begrijpen van de communicatie tussen parasympatische zenuwcellen en luchtweg gladde spiercellen, zodat we in de toekomst verbeterde astmamedicatie kunnen ontwikkelen.

Proefdiervrij model van het zenuwstelsel in de longen

Om de interactie tussen zenuwcellen en spiercellen goed te kunnen begrijpen, hebben we een model nodig om deze interacties te kunnen bestuderen. Vaak worden hier biopten van longen van astmapatiënten en proefdieren voor gebruikt. We hebben hier al veel informatie uit kunnen halen, maar er zitten een aantal beperkingen aan. Patiënt-biopten geven een momentopname weer, en zullen weinig informatie

verschaffen over het pathofysiologische proces. Proefdieren, zoals muizen, ratten en cavia's, zijn veel ingezet om longonderzoek te doen, maar schieten tekort in studies naar het functioneren van het zenuwstelsel. Het zenuwstelsel van de longen van muizen en ratten is namelijk lang niet zo complex als dat van mensen, en is dus niet heel representatief als model. Bovendien reageren muizen en ratten heel anders dan mensen op bekende allergenen. Cavia's reageren meer zoals mensen op allergenen en hebben een complexer zenuwstelsel in de longen, maar missen de mogelijkheid tot genetische modificatie om meer te leren over de processen die aan veranderingen in het zenuwstelsel bij astma ten grondslag liggen. Wij proberen deze struikelblokken uit de weg te nemen door een *in vitro* model te ontwikkelen met menselijke cellen, om zo meer te leren over de communicatie tussen zenuwcellen en gladde spiercellen, en over de processen die zorgen voor veranderingen in deze communicatie bij astma.

Het proefschrift start in **Hoofdstuk 2** met een uitgebreid literatuuronderzoek naar de mogelijkheden om een model te maken zonder het gebruik van proefdieren. Traditionele methodes blijken hierin beperkt, zoals het isoleren van cellen uit weefselbiopten van patiënten en die verder kweken. Voor veel cellen is dit mogelijk, maar niet voor zenuwcellen. Voor het ontwikkelen van een human *in vitro* model moeten we gebruik maken van een recent ontwikkelde technologie: pluripotente stamcel-technologie. Pluripotente stamcellen kunnen zich differentiëren tot elk type cel; ook parasympatische zenuwcellen. Je laat de cellen als het ware de embryonale ontwikkeling doorlopen in een petrischaal. Er bestaat alleen nog geen protocol voor de differentie van parasympatische zenuwcellen vanuit pluripotente stamcellen. Daarnaast beschrijven we het gebruik van organen-op-chips om de communicatie tussen longcellen en het zenuwstelsel nog beter na te bootsen. Zenuwen communiceren met andere cellen d.m.v. neurotransmitters die de uitlopers uitscheiden, i.p.v. direct contact tussen de cellen. Door cellen te laten groeien in een zogenaamde microfluidische chip kan men de cellichamen van elkaar scheiden, en de zenuwuitlopers gebruiken voor communicatie tussen de cellen (Figuur 1, rechts).

Type 2 ontstekingen en neuronale remodeling

Omdat zo'n model nog niet beschikbaar is, startten we ons onderzoek met een humaan model wat al wel beschikbaar is: patiënt-biopten. In **Hoofdstuk 3** onderzoeken we de correlatie tussen neuronale remodeling bij astmapatiënten en de veranderingen in genexpressie. Deze analyse toonde aan dat niet alle type ontstekingen correleren met neuronale remodeling. Zogenaamde neutrofiële astma en metabole astma lieten een negatieve correlatie zien. Als derde type blijft de eosinofiele astma over, die gepaard gaat met type 2 ontstekingen gecombineerd met de eerdergenoemde IL-4, IL-5 en IL-13.

Hier gaat het proefschrift in **Hoofdstuk 4** verder op in, waar we een *in vitro* model maken van primaire gladde spiercellen en een cellijn die parasympatische zenuwcellen voorstelt. De gladde spiercellen werden geïsoleerd en opgekweekt uit bronchiaal

weefsel, terwijl de cellijn SH-SY5Y, waarmee zenuwcellen worden nagebootst, uit een neuroblastoom (kanker) is geïsoleerd. We kweekten deze celtypes samen om de interactie te bestuderen, en te bestuderen hoe ze reageren op type 2 ontstekingen door ze te stimuleren met IL-13, en een nieuwe signaalstof die IL-33 heet. IL-33 is bekend als een signaalstof die type 2 ontstekingen in gang zet, maar er is meer en meer bewijs dat IL-33 ook nog andere functies heeft. Wij vonden dat IL-33 ook zorgt voor remodeling van gladde spiercellen en neuronen wanneer we deze cellen samen in kweek brachten. Gladde spiercellen lieten een hogere expressie van myosine zien, een belangrijk onderdeel van de moleculaire machine die zorgt voor spiercontractie. Daarnaast was de expressie van BDNF verhoogd. BDNF zorgt in de longen onder normale omstandigheden voor neuronale ontwikkeling en functie, maar een teveel aan BDNF kan leiden tot extra ontwikkeling van zenuwuitlopers, en dat is onwenselijk. Dit is een belangrijke aanwijzing over hoe het immuunsysteem bijdraagt aan de remodeling van de cellen in de longen bij astma.

Pluripotente stamcel-technologie voor de ontwikkeling van humane parasympatische zenuwcellen

We zijn nog niet tevreden over het gebruik van de SH-SY5Y cellijn om het zenuwstelsel van de longen na te bootsen, zodat we in **Hoofdstuk 5** een literatuurstudie deden naar hoe pluripotente stamcellen kunnen bijdragen aan longonderzoek en -behandeling. Tot nu toe is er veel focus geweest op de epitheelcellen van de longen, die normaal gesproken de eerste fysieke barrière vormen voor bescherming tegen stoffen van buitenaf, en bovendien belangrijk zijn voor zuurstofopname. Voor andere longcellen zijn de differentiatieprotocollen schaars. Er zijn geen protocollen beschikbaar die luchtweg gladde spiercellen of het zenuwstelsel van de longen na kunnen bootsen. Vooral de zenuwcellen zijn een groot gemis, zodat we in **Hoofdstuk 6** zelf een protocol voor de differentiatie van parasympatische zenuwcellen ontwikkelden.

Parasympatische zenuwen in de longen ontwikkelen zich vanuit de belangrijke *nervus vagus*, van waaruit veel perifere zenuwen ontspruiten. Veel van deze zenuwen gaan tijdens de embryonale ontwikkeling door een stadium dat "*neurale crest*" heet, wat het centrale zenuwstelsel met de organen in de periferie verbindt. Luchtwegzenuwcellen ontstaan uit de vagale neurale crest, waarna ze zenuwuitlopers ontwikkelen. De zenuwuitlopers worden aangetrokken door BDNF, wat door luchtweg gladde spiercellen uitgescheiden wordt. H9WA09 embryonale stamcellen, een vorm van pluripotente stamcellen, werden in 16 dagen gedifferentieerd tot vagale neurale crest cellen door het remmen van BMP/TGF- β signalering, gevolgd door activatie van Wnt signalering. Deze vagale neurale crest cellen werden vervolgens tot 50 dagen verder gestimuleerd met neuronale factoren zoals B27 en N2, en specifiek met BDNF om luchtweg parasympatische neuronen te verkrijgen.

De verkregen parasympatische neuronen lieten duidelijk kenmerken zien van luchtweg parasympatische neuronen, die acetylcholine als hun neurotransmitter gebruiken. De neuronen zijn positief voor VACHT, vesicles voor acetylcholine transport, en voor ChAT, het enzym dat de voorloper van acetylcholine omzet in acetylcholine. Daarnaast reageerden de neuronen zelf ook op stimulatie met acetylcholine, als indicatie dat we functionele luchtweg cholinerge neuronen hebben verkregen.

Eerste experimenten waarin de zenuwcellen samen met luchtweg gladde spiercellen zijn gekweekt lieten zien dat beide celtypes samen gekweekt kunnen worden en levensvatbaar zijn. Daarnaast hebben we onderzocht of stimulatie met type 2 signaalstoffen, zoals IL-5, -13 en -33 een effect had op de zenuwcellen. Hiervan zagen we geen effect, maar het is goed mogelijk dat deze signaalstoffen alleen een indirect effect hebben via gladde spiercellen, zoals we vonden in **Hoofdstuk 3**. Wat wel heel interessant is, is dat stimulatie van de neuronen met dexamethason lijkt te leiden tot verminderde vorming van zenuwcellen, en ook dat ze minder actief zijn. Dexamethason is een sterke glucocorticosteroïde. Glucocorticosteroïden worden vaak voorgeschreven in de vorm van astma-inhalers om de symptomen onder controle te houden. Dit gebeurt door hun ontstekingsremmende werking,. Het was niet eerder bekend dat glucocorticosteroïden een dergelijk effect hebben op het zenuwstelsel. Deze neuronen, verkregen via pluripotente stamcel-technologie, zijn een goed model om meer te leren van processen in zenuwcellen in de longen, zowel bij gezondheid als bij ziekte.

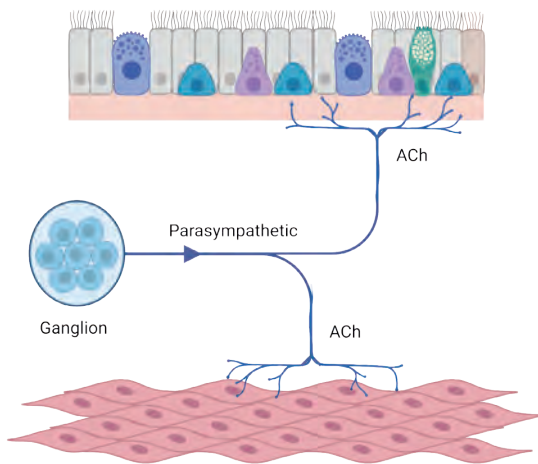
Het luchtweg zenuwstelsel-op-een-chip

Zoals hierboven kort aangestipt, heeft literatuuronderzoek in **Hoofdstuk 2** laten zien dat een microfluidische chip de cellichamen van elkaar kan scheiden, en de zenuwuitlopers gebruikt voor communicatie tussen de cellen. In **Hoofdstuk 7** ontworpen we een microfluidische chip, bestaande uit twee compartimenten (Figuur 1). Het ene compartiment is voor de kweek van zenuwcellen, en het andere compartiment voor gladde spiercellen. De twee compartimenten zijn met elkaar verbonden door microkanaaltjes. Deze kanaaltjes zijn zo klein (3 μm x 3 μm) dat cellen (> 10 μm) er niet doorheen passen, maar dat er wel zenuwuitlopers doorheen kunnen groeien. Via deze zenuwuitlopers kunnen beide celtypes met elkaar communiceren, net zoals in het lichaam zou gebeuren. De chip is gemaakt van PDMS, een flexibel plastic, maar heeft een dunne glazen onderkant. Door een glazen microscopische coverslip te gebruiken voor de onderkant is het heel makkelijk om cellen direct in de chip te visualiseren tijdens en na experimenten.

Het kweken van stamcel-geïnduceerde neuronen op de chip voor langere tijd was succesvol, en ook in de chip konden we bevestigen dat de neuronen functioneel zijn. Verder zagen we dat de neuronen binnen enkele dagen de gladde spiercellen konden innerven, en met een fluorescente imaging-techniek konden we de vorming van synapsen aantonen. Synapsen zijn een belangrijke indicator van communicatie tussen neuronen en effectorcellen.

Conclusie

Samengevat laat dit proefschrift de ontwikkeling zien van een human model waarmee zenuw-spiercel interacties in de longen kunnen worden bestudeerd. Ondanks de belangrijke sturende rol van zenuwcellen zijn er nog geen astmamedicijnen die zich direct richten op het zenuwstelsel. Dit is mede door de afwezigheid van een goed model om dit medicijnonderzoek op te doen. De beschikbaarheid van een model om het zenuwstelsel van de luchtwegen beter te kunnen bestuderen zal bijdragen aan nieuw medicijnonderzoek, met als doel de kwaliteit van leven van miljoenen astmapatiënten te verbeteren.



Figuur 1 Het parasympatische zenuwstelsel in de longen Links: Parasympatische zenuwuitlopers innervieren luchtweg gladde spiercellen en epitheelcellen. Door middel van de neurotransmitter acetylcholine kunnen zij epitheelcellen aanzetten tot het produceren van slijm, of gladde spiercellen tot samentrekking. Een teveel aan samentrekking kan leiden tot luchtwegvernauwing. Rechts: Microfluidische chip voor het nabootsen van de interacties tussen zenuwcellen en gladde spiercellen in de longen. In het linker compartiment (blauw) worden zenuwcellen gekweekt, en in het rechter compartiment (rood) worden luchtweg gladde spiercellen gekweekt. De twee compartimenten zijn verbonden door microkanaaltjes, waar alleen zenuwuitlopers doorheen passen. Dit humane in vitro model kan gebruikt worden om interacties tussen zenuwcellen en gladde spiercellen beter te begrijpen. Gemaakt met Biorender.com.

Dankwoord/Acknowledgements

Op 4 september 2017 was ik in Groningen op weg naar mijn nieuwe kantoor. Niet op 1 september, want toen zat ik nog vast in Costa Rica door orkaan Harvey. Zodra het kon zette ik koers naar Groningen, waar ik hartelijk werd ontvangen door Reinoud en Amalia. En nu, anno 2022, kijk ik met een ontzettend goed gevoel terug op de afgelopen vijf jaar. Mede doordat ik trots ben op het werk dat ik heb neergezet, maar ook door de fantastische herinneringen die ik in Groningen heb gemaakt. Graag wil ik iedereen bedenken die heeft geholpen bij het tot stand komen van dit proefschrift, op wat voor manier dan ook.

Allereerst **Reinoud**, ik had me geen betere promotor kunnen wensen dan jij. Geheel terecht heb je een paar jaar geleden dan ook de PhD supervisor of the year-award gewonnen! Tijdens onze wekelijkse meeting gaf je veel ruimte aan mijn input, maar je wist het wel altijd in de goede richting te sturen om zo ideeën nog sterker te maken. En naast je academische taken was je ook altijd te porren voor een biertje of een pubquiz avond. Wat ik vooral nooit zal vergeten is je reactie op mijn RSI klachten: empathisch en tegelijk praktische zorgen wegnemen. Je bent een voorbeeld voor mij in mijn toekomstige loopbaan.

Amalia, thank you for all the supervision and care for the past five years. I could always find you with a smile on your face and found you, diligent, hard-working, enthusiastic about every project, despite being frustrated by the bureaucratic barriers. However, with your strong willpower and extensive network around, you always get things working! Besides, the academic support, you were always personally involved with all your students, caring about their lives and careers, which is very much appreciated. We also shared many personal stories and hugs in the office.

Martina, ook van jou heb ik veel geleerd de afgelopen jaren. Hoe je met mensen omgaat, hoe je efficiënt moet werken, hoe je goed voorbereid je presentaties in moet gaan. Maar het meeste misschien nog wel jouw doorzettingsvermogen. Deze is mij vooral goed bijgebleven tijdens jouw verjaardags-symposium: *“there is always an alternative pathway”*.

Hetzelfde doorzettingsvermogen zie ik bij jou **Barbro**. Hoe je ook met soms een kleine (of grote) tegenslag weer terugkomt, en je weer vol kan storten op het najagen van je dromen en carrière. Een powervrouw die zich inzet voor waar ze achter staat, ontzettend gaaf.

Loes, voor mij ben jij een voorbeeld qua werkmentaliteit. Op kantoor ben je aan de slag en werk je efficiënt, maar daardoor is er 's avonds tijd voor familie, sporten en een borrel. En daarnaast lekker rechte doorzee in communicatie, zodat er geen ruimte is voor

misinterpretaties, terwijl er nog wel ruimte is voor interesse in de andere persoon. Bedankt voor deze lessen, en je waardevolle feedback op mijn werk altijd. Ik wens je al het beste met Aquilo, en hopelijk worden de neuronen in je portfolio geïmplementeerd!

I would also like to thank the members of my reading committee, **Prof. Allison Fryer, Dr. Kerensa Broersen and Prof. Peter Olinga**, who took the effort to read and critically review my thesis.

Querida **Angelica**, me siento honrada de que seas mi paraninfa. I am honored that you want to be my paranymp. I remember when you arrived here in Groningen for your dual PhD degree: I thought it was cool that you were from Colombia, and that I could maybe practice my Spanish with you. But it turned out that you became one of my best friends in Groningen. We could always find each other's company inside and outside of the lab. I feel thrilled that we got to start up the stem cell lab together, and proud that we succeeded! And I will ever be grateful for all the help you offered to be my pair of hands. After working hours we had so many joint adventures, such as, going for bouldering, biking and not to forget, the spa-days. I loved how the back door of your house was always open, offering a gate to delicious food, bottles of wine, deep conversations accompanied by laughter or tears (or tears of laughter). I hope that we stay friends for many years. Muchas gracias, mi amiga.

Dear **Akshaya**, you walked in as my first student I was supervising in Groningen together with Angelica, and now we finish with you being my paranymp! It was a delight having you around in the past years. You are one of the most bubbly people that I know, radiating your positive energy onto everybody else. You were always open to learning new recipes and learning new hobbies, which led to our vegetable garden! Do you remember how we were digging for gold?! The pleasure that some potatoes can bring. I can't see a worm now without thinking of you! And how your ever-brave personality trusted me and Angelica to take you ice skating on a lake. I have so many good memories of our city strolls, coffee to-go, just chatting for hours about literally every topic in life. Thank you for all the high and low times that we shared, I am so grateful for that. I wish that we can keep on sharing for many years to come.

Sophie, ik heb je pas in de tweede helft van mijn tijd in Groningen goed leren kennen, maar wat was dat speciaal. Zo leuk om te zien met hoeveel enthousiasme en energie je nieuwe dingen oppakt, en ook het praktische werk je snel eigen maakt. En kopjes thee zijn bij jou net zo belangrijk als de stamcellen in leven houden, daar hebben we er ook flink wat van op. Je bent denk ik een van de meest creatieve mensen die ik ken: ik zal geen haak- of breinaald meer kunnen zien zonder aan jou te denken. Maar ook als er wat leuks georganiseerd moet worden, bij jou ben je aan het juiste adres voor iets attents en origineels! En door kleine cadeautjes (zelf gebreide handschoentjes!) voel je zo welkom bij jou. Bedankt voor al je gezelligheid, zorgzaamheid en support!

Jij hebt me in het begin heel erg wegwijs gemaakt in Groningen **Carolina**. Wie ik waarvoor moest hebben, hoe ik alles moest installeren, hoe ik me vooral niet gek moet laten maken door een PhD. Waar ik vooral goede herinneringen aan heb zijn onze tripjes samen naar het slachthuis. Ik was toch wel even onder de indruk van zo'n luchtpijp, maar jij wist er wel raad mee. Waar ik in het begin nog onhandig was, heb jij me goed getraind in de cel isolatie, met veel geduld en precisie. Jouw trainingsmethode was voor mij een inspiratie om zelf over te nemen.

Marina TL, with your humble personality combined with your creativity and intelligence, it is no wonder that you were loved in the lab from the week you walked in. I'm grateful that we became good friends in Groningen and for all the time spent in your and **Riccardo's** house, chatting, painting, cuddling with the girls. No matter when I arrived, I always felt welcomed to your house. Thank you for all the support in the lab, be it lab work, brainstorming on new research ideas, or a much-needed coffee break. With your passion for science and your hardworking mentality, you will achieve wonderful things in life!

Asmaa, thank you for the past years in Groningen. I loved hanging out and chatting with you, be it on research or hair/beauty talk, there was always laughter and a smile involved! I will never forget how you always secretly took your glasses off whenever it was picture time, it always made me chuckle. You seem like a supermom to me, keeping your family and household running while dealing with cells and publications. But most strong you are in setting the right boundaries for yourself. You are doing great!

Thanks to all my office buddies making me feel welcome and excited to come to the lab! **Inge**, we always sat at the window together, sharing the office view with a coffee and a chat. I missed you for our usual pub-quizzes at the Toeter when you were gone! **Vicky**, always working hard, as well as, enjoying your time at work. I will miss our garden-chats. **Tong**, I always find your research on memory storage really cool! I am excited to learn about your findings. **Melody**, you were always in the mood for a little chat, giving each other little pep talks. I will never forget the poké bowls that you introduced us to. **Chiara**, passionate about science and about Italian food. It was lovely sitting next to you, talking about food, science, or preparing for the pubquiz with random Wikipedia pages! **Guilherme**, you came over twice from Brazil, and I can only say that I'm happy that I got to know you. It felt so good to have a buddy working on a similar research project, so we could help each other out on experiments and literature searches. This helped me more than you probably realize.

Xinhui, you were the first person that properly introduced me to Chinese food. I sometimes try to make hotpots at home now, but nothing beats Chef Xin. Thank you for all the time spent together in the lab as well, finding my way around, going to conferences, making sure that all our memories are captured. I think that over half of

my photo's in Groningen are with you! **Mariska**, jij bent ook één van de meest zorgzame (oud-)collega's van Moleculaire Farmacologie, een geboren moeder. Hoe jij ervoor zorgde dat mensen ook goed voor zichzelf zorgen, al is het maar met een lief woord of een kopje thee. I really enjoyed our time in Berlin with the three of us, I wish we could have done a trip again!

Ayha, we both started around the same time, and are also finalizing our work around the same time. Sharing so many memories in the lab, the Toeter, at conferences. All memories that I cherish. I learned a lot from your culture, your view of the world. You are a beautiful person Ayha, with your heart at the right place and an unbearable tolerance for spicy food. On top of that you were irreplaceable during our pubquizzes! Nobody else would have known the latest gossip of the Kardashians! I am wishing you all the best, finalizing in Groningen and later as a teacher.

If you were in the mood for some pingpong, **Zaid** was always around! I tremendously enjoyed our rounds of pingpong, equally matched and both eager to win. I think you won most competitions eventually, but we both won in this amazing stress-reliever. Please get more people to paddle for a little break! It was great having you as a colleague, always laughing and in for a joke. And doing a wonderful job now as a father!

Marina de Jager, we spraken elkaar pas nadat onze labs samen waren gevoegd, maar ik zal je grote bos krullen en immer positieve instelling niet vergeten. Alles wat je deed, zette je je voor in en deed je met plezier. Als ik jou zie **Annet**, of aan je denk, is het eerste wat er in me opkomt: "Alles komt goed.". Dat is jouw mantra en ook je aura, wat je uitstraalt naar iedereen. Zo leuk dat we allebei de Camino gelopen hebben, en toevallig dat we op dezelfde dag vertrokken zijn! Ik had je graag meer gesproken. Maar het maakte niet uit hoe vaak je jou sprak, je behandelde iedereen met evenveel compassie. Dank voor al je tips voor de Camino en je lieve berichtjes. Ik hoop een stukje van jouw levensinstelling met me mee te nemen.

Janneke, ik denk dat jij wel de meest reislustige secretaresse bent die ik ooit heb gezien. Je ogen glommen altijd als we kletsen en foto's keken van ons beider reizen. Ik hoop dat je nog vele reizen gaat maken, en er veel vandoor bent in je busje! **Brenda**, leuk dat ik jou nog heb leren kennen! Je deur stond altijd (letterlijk) open, en je was altijd in voor een praatje. Ik wens je nog veel fijne jaren bij MF! **Gillian**, je was maar een paar maanden in ons kantoor, maar vanaf dag één voegde jouw aanwezigheid een hoop extra sfeer toe! Ik hoop dat je altijd zo blijft!

Luke, Joana, Christina, Manon, Irene, I would like to thank all of you for being my student! I had the best time with all of you, having fun in the lab while also teaching you some cell culture work. **Luke**, je begon als mijn student in onze groep, en uiteindelijk werd je zelfs mijn collega! Met je energie, je enthousiasme, en je aanstekelijke lach (die

door elke muur heen dringt) was het ontzettend leuk je weer terug te zien! Het was zo leuk om je eerst te zien groeien als student, en dan nu zelfverzekerd als PhD door het lab te zien lopen. And later with the little sister **Joana**, we became a small MF family. **Joana**, with endless energy, positivity, and never-ending stories. I had such a good time with the two of you, always laughing and joking around. You both made student supervision the best part of my PhD. I still chuckle when thinking back of the little family that we formed in the lab. You were the best kids that I can imagine: learning fast, well behaved, and in the possession of a First Aid certificate. I loved that we had family dinners and a family WhatsApp groupchat. And the fact that you are both pursuing further in science and research makes me glow from the inside. **Christina, Manon, Irene**, bedankt voor de tijd dat ik jullie begeleider mocht zijn voor jullie masterproject. Jullie werkten alle drie ontzettend hard, maar met genoeg ruimte om ook te lachen en te geinen met de andere studenten. Het was altijd een weg naar het vinden van nieuwe protocollen en nieuwe markers, waarin jullie veel pionierswerk verzet hebben. I am wishing you all the best in your future career paths.

Nad'a, it was great to find someone in the lab with a similar energy! It was a pleasure training you in the chips, but mainly all the chats we had during the waiting steps. You always know what you want, and you will let people know! I love this about you, getting some action in there. With your open and positive mindset and your bold personality, I am sure you will push some boundaries and get further to what you envision. **Alejandro**, hoe gaat het met jou? I look back with pleasure on our small language interactions in the office. You always brought good spirit to the lab and connected with everyone. The more the merrier is your motto, and please let there be a *cerveza*. **Rosa**, ik heb je als MSc student in ons lab leren kennen, en zo leuk dat je daarna terugkwam als PhD student! Je bent gedreven in je werk, maar zodra het even kan laat je ook je niet-serieuze kant graag zien! Je was altijd oprecht en sociaal richting iedereen, en het was gezellig samen tijdens lunch, borrels, en in de Toeter! **Sara**, wherever you walked in, you brought your big smile with you, no matter the status of your experiments! **Tiago**, it was such a pleasure to get to know you. I will never forget the scene at the arepa stand in which you were playing Angie! Always up for everything fun! Wishing you all the best for and after your PhD!

Hoeke, ik weet nog dat je terugkwam in ons lab en dat ik je tijdens een lab outing leerde kennen, en het klikte gelijk! Het was altijd gezellig met jou tijdens de lunchpauzes, met onze gezamenlijke passie voor sporten. En daarnaast heb ik je ontzettend veel statistiek advies gevraagd, dank daarvoor! Je doet het fantastisch als docent die benaderbaar is en veel geduld heeft. Leuk dat we nog een keer samen gefietst hebben, wie weet kom ik je nog een keer op een sportevent tegen! **Melissa**, je begon als Hanze student bij ons maar bent blijven hangen, hartstikke leuk! Je kon jou altijd zien lachen, en het hoefde allemaal niet zo serieus. Behalve haarstyling dan: krullen zijn een serieuze zaak! **Manon**, ik weet nooit helemaal of je nou voor de RUG of voor Aquilo werkt, maar ik weet wel

dat je onmisbaar bent in het lab met wat je allemaal doet, weet en regelt. Hopelijk blijf je nog een tijdje hangen! **Kimberly, Iris**, ik wens jullie al het beste bij Aquilo.

Marina MR, we only spend a short time together, but I loved our times we went out for drinks, quizzes, and ADE! **Haoxiao**, I have never seen anyone as hardworking as you did. Not wasting your energy on complaining, just getting the job done! **JP**, you had a vision for your academic future and went for it! Wish you all the best in your career. **Habibie**, you were so loving to the people around you, taking care of them, and always very interested in others. It was a pleasure having you as a colleague. **Nshunge**, it was always great laughter with you! Sharing stories about your kids and your own childhood adventures was always hilarious. **Fransien**, als jij het lab in liep (altijd in supervette sneakers!) dan nam je een hoop positieve energie mee! Ik moest zo lachen toen je de wasmachine voor ons lab geregeld had, hoe simpel je moet denken voor ingewikkeld onderzoek. En je straalde een energie uit bij je talk over microplastics. Waar je ook terecht komt, jij gaat er het beste van maken!

Birgit, I have great memories of our celebrations in Bonn! In the lab you were always hard working and dedicated, but after work activities really do not involve work for you! And **Isabella**, remember our trip to the Christmas market in Bremen! You were always so peaceful walking around in the lab. Same for you **Salomao**, you always seemed so relaxed, while working hard both in the Netherlands and remotely in Brazil. I remember the Gall&Gall was your favorite shop after you discovered its pleasures! **Birgit, Isabella, Salomao**, thank you for the time we spent together in the lab, and I am wishing you all the best for your futures.

Shanshan, you were always very caring and interested. I am sure your curious personality will get you far in science. **Dan**, always a pleasure encountering you and your smile. Hope to once dance some Samba together! Or was it Zumba?! **Hong, Tingting, Yang**, I loved watching you both chatter and being passionate about Asian food. Hopefully we once get the pleasure of getting drinks together at Moong. **Tati**, thank you for the time we spent together in the MF group. **Gwenda, Annienke** en **Jelmer**, bedankt voor de momenten die we konden delen tijdens congressen en tijdens ons onderzoek in de MF groep! **Carli**, toen ik je leerde kennen voor de overdracht had ik gelijk het idee dat je goed zou passen in de groep! Ik wens je veel plezier met je PhD! **Ahmed, Xiaopeng** I am wishing you all the best in the MF group.

Patty en **JP**, bedankt voor alle koffies en lach-momenten als ik weer eens '*naar de tweede verdieping*' kwam. Hard werken moest gedaan worden, maar pauze is ook essentieel. En **Patty**, jij nog meer bedankt voor al je assistentie tijdens mijn chip-fabricage proces. Zonder jou was de chip nooit een succes geworden! Ik wens je nog veel fijne jaren toe bij de RUG, en wie ook met jou mag samenwerken: diegene is een bofkont! **JP**, altijd leuk om jou op de tweede verdieping (of random ergens anders) tegen het lijf te lopen!

De veiligheidstraining is een serieuze zaak, maar de rest van het leven nemen we met een korreltje zout, toch?

Lena, thank you for the collaboration with the stem cells, and all the advice and suggestion we could exchange. I enjoyed training you and working together, it always felt like a two-way street with you, both being open and also respecting each other's work. I would 100% collaborate with you again. I am wishing you all the best in your PhD and after!

En zonder de steun van vrienden en familie was ik niet geweest waar ik nu was. **Mam, pap**, bedankt dat jullie er altijd waren de afgelopen jaren. **Mam**, je was er altijd als ik niet-academisch advies nodig had over het verloop van mijn scriptie, of als ik even mijn ei kwijt moest. En **pap**, je hield me altijd scherp over mijn eigen werk met je diepgravende interesse. **Jette** en **Winnie** bedankt dat ik altijd met mijn verhalen bij jullie mocht komen, jullie mentale support als dat nodig was, zowel bij positieve als negatieve events. Dat ik jullie allemaal altijd op elk moment kan bellen betekent veel voor me.

Annet en **Wil**, zonder jullie zolder-kantoor had ik het laatste stuk van mijn scriptie niet zo snel kunnen schrijven in Den Bosch, prachtig versierd met tekeningen van **Milou** en **Rosa**. Wat zeker heeft geholpen is de grote pot koffie die altijd klaar stond om 8:30u, en Wil die me daarna naar boven stuurde omdat het toch wel echt tijd werd om te beginnen.

Dan de mentale support van vriendinnen, dank dat ik tegen jullie eindeloos over mijn onderzoek mocht praten. En ook dank dat jullie me af en toe meenamen om juist even niet over mijn onderzoek te praten! Hoe wij elkaar tijdens het klimmen hebben leren kennen. **Koosje**, en dat nog lang samen gedaan hebben! Klimmen bleek echt de perfecte meditatieve activiteit om even je gedachten te verzetten. Je passie voor de natuur, foerageren en vogeltjes werkt aanstekelijk, ik kan geen vogel meer zien zonder aan jou te denken! **Lisa**, roomie, ik kijk met zo'n warm gevoel terug op onze spelletjes, series en barbecues die we in ons appartementje gedaan hebben. Waar we samen konden lachen en konden huilen over het leven van een PhD student. Waar we samen door corona en andere struggles heen zijn gekomen. Ons huis was dé plek waar we over letterlijk alles konden praten. Lieve Lisa, bedankt dat jij bent wie je bent. **Lotte**, we waren maar heel kort huisgenootjes maar hebben elkaar nog zoveel gezien! Het was altijd heel speciaal met jou, ik wens jou en je avontuurlijke geest het allerbeste toe. **Ellen**, de sauna bezoeken met jou samen als we even aan ontspanning toe waren. Waar we eindelijk hebben liggen kletsen naast het ontspannen, en zelfs onze trip naar Australië gepland hebben. Lang leve internationale congressen! En **Marie-Luise**, hoeveel uren hebben wij wel niet gebeld, samen sparren over ons onderzoek, in onze gesprekken afgeleid door andere dingen, om vervolgens weer terug te komen bij onderzoek. Met jou beleef ik mijn passie voor de wetenschappelijke wereld op zijn best. En dan dank

aan alle andere vriendinnen die bij hebben gedragen aan de mooie herinneringen van de afgelopen jaren.

Het allermeest wil ik toch wel **Thijs** bedanken voor zijn grenzeloze support. De moeite die je de afgelopen jaren hebt gedaan voor onze afstandsrelatie Den Bosch-Groningen, om proberen te begrijpen waar mijn scriptie over gaat, de highs en de lows van de PhD waar je met mij samen doorheen bent gegaan. En dat allemaal terwijl je zelf ook nog een succesvol bedrijf hebt opgezet in die tijd. Petje af voor jou. En tijd om nu samen in Den Bosch aan een nieuw hoofdstuk te beginnen.

Curriculum vitae

The author of this thesis was born in Rijswijk, The Netherlands, on the 1st of July in 1992. In 2010, she studied Human Nutrition at Wageningen University. During her Bachelor studies, she did a minor in Lund, Sweden, in Food Technology. Later she wrote her Bachelor thesis on the Positive side effects of statins, at the department of Nutrition and Pharmacology (supervised by prof. dr. Renger Witkamp). In 2014 she obtained her Bachelor's degree, after which she started her Master studies in Molecular Lifesciences, specializing in Biomedical Research. During her studies she was a student-assistant for a study on colorectal cancer in the group of Nutrition and Disease under supervision of Renate Winkels. She performed a Masters research project on the Development of microfluidic chips for rare cell isolation at the University of Twente, Enschede, the Netherlands (supervised by prof. dr. Leon Terstappen), after which she worked for several months as a research assistant to continue the project. Her final master project was on the Characterization of bio-ink and multicellular integration for 3D muscle bioprinting, at Harvard University, Boston, USA (supervised by dr. Sebastien Uzel and prof. dr. Aldrik Velders). After completing her Master in 2017, she initiated her PhD study at the department of Molecular Pharmacology, University of Groningen, where she worked on a research project funded by More Knowledge with Fewer Animals (Meer Kennis met Minder Dieren) programme of ZonMW (grant number 114021505) with co-financing from Stichting Proefdiervrij, Aquilo BV, Boehringer Ingelheim and Longfonds, under the supervision of prof. dr. Reinoud Gosens and prof. dr. Amalia Dolga. Her research focused on the development of an in vitro model for the study of airway neurobiology. The results of her PhD study are presented in this thesis. At the end of her PhD term, Pien successfully applied for a position as a study director at Charles River, Den Bosch.

List of publications

Goldsteen, P.A., Yoseif, C., Dolga, A.M. and Gosens, R., 2021. Human pluripotent stem cells for the modelling and treatment of respiratory diseases. *European Respiratory Review*, 30(161).

Goldsteen, P.A., Dolga, A.M. and Gosens, R., 2020. Advanced modeling of peripheral neuro-effector communication and-plasticity. *Physiology*, 35(5), pp.348-357.

Preprints

Goldsteen, P.A., Guaqueta, A.S., Bos, I.S.T., Kistemaker, L.E.M., van der Koog, L., Eggens, M., Halayko, A.J., Dolga, A.M. and Gosens, R., 2022. Differentiation of airway cholinergic neurons from human pluripotent stem cells for airway neurobiology studies. *bioRxiv*.

Published abstracts

Goldsteen, P., Mulder, P., Kistemaker, L., Soeiro, J., Mathwig, K., Dolga, A. and Gosens, R., 2021. Pluripotent stem cell derived airway cholinergic neurons for disease modelling of neuroplasticity in asthma. *European Respiratory Society*

Rahmawati, S.F., **Goldsteen, P.**, Bos, S., Kerstjens, H., Dolga, A., Kistemaker, L. and Gosens, R., 2021. Corticosteroid effects on airway neuroplasticity in experimental models of asthma. *European Respiratory Society*

Goldsteen, P., Mulder, P., Kistemaker, L., Soeiro, J., Mathwig, K., Dolga, A. and Gosens, R., 2021. Pluripotent stem cell derived airway cholinergic neurons for disease modelling of neuroplasticity in asthma. *European Respiratory Society*

Goldsteen, P.A., Van Der Koog, L., Kistemaker, L.E.M., Prakash, Y.S., Ditz, B., Van Den Berge, M., Koppelman, G.H., Nawijn, M.C., Dolga, A.M. and Gosens, R., 2020. IL33 regulates airway neuronal plasticity in vitro. *European Respiratory Society*

Goldsteen, P.A., Mulder, P.P.F.M.A., Kistemaker, L.E.M., Soeiro, J.S., Mathwig, K.H., Dolga, A.M. and Gosens, R., 2020. A Miniature Human Lung for the Study of Cross Talk Between Airway Smooth Muscle and Cholinergic Neurons. *American Thoracic Society*

