

De rol van epitheel-naar-mesenchym transitie bij luchtweg herstructurering in astma

Auteur: Britt Hevink
Begeleider: Irene Heijink
Datum: 13-07-2012

Bachelorscriptie Biologie – Biomedische wetenschappen
Rijksuniversiteit Groningen

Samenvatting

Wereldwijd lijden er 300 miljoen mensen aan de chronische longziekte astma. Bij deze ziekte zijn de bronchiën continu ontstoken waardoor de luchtwegen prikkelbaarder worden en vernauwen. Dit heeft tot gevolg dat de patiënt moeite heeft met ademen, een goede behandeling is hierdoor gewenst. De huidige behandeling haakt in op het ontstekingsproces door de toediening van corticosteroiden. Dit remt echter de structurele veranderingen in de luchtwegwand niet. Deze structurele veranderingen worden *luchtwegremodeling* (herstructurering) genoemd. Er treedt onder andere fibrose van het subepitheel en angiogenese op en er worden meer gladde spiercellen gevormd. Naast deze remodeling treden er ook veranderingen op in de buitenste laag van de luchtwegwand, het epitheel. Het epitheel heeft onder normale omstandigheden een beschermende functie tegen micro-organismen, gassen en allergenen. De barrière die het epitheel vormt wordt in stand gehouden door zogeheten junctions die zorgen voor contacten tussen cellen. Bij de ziekte astma zijn deze cel-celcontacten verminderd en is de barrière die het epitheel vormt aangetast. Het vermoeden bestaat dat de luchtwegremodeling en veranderingen in het luchtwegepitheel ontstaan door een proces genaamd epitheel-naar-mesenchym (EMT) transitie. Bij het EMT proces veranderen epitheelcellen langzaam in cellen met een mesenchymaal fenotype, bij. Deze mesenchymale cellen hebben minder cel-celcontacten en brengen andere eiwitten tot expressie dan de epitheelcellen. Het EMT proces kan worden geïnduceerd door bepaalde signaalstoffen, zoals TGF- β dat verhoogd wordt gevonden in de luchtwegen van astmapatiënten. Huisstofmijt kan dit nog eens bevorderen. In deze scriptie wordt de hypothese gesteld dat het EMT proces een rol speelt bij luchtweg remodeling in astma.

Inhoudsopgave

	<i>Pagina</i>
1. Inleiding	4
2. Pathofysiologie van astma	5
2.1 Kenmerken astma	5
2.2 Oorzaak	6
2.3 Behandeling	6
2.4 Rol van het epitheel bij de ontwikkeling van astma	6
3. Epitheel	8
3.1 Functie	8
3.2 Veranderingen bij astma	9
4. Remodeling	10
4.1 Ontstaan van remodeling	11
4.2 Fibrose van het subepitheel	11
4.3 Verhoogde gladde spiercelmassa	12
4.4 Angiogenese	12
4.5 Overmatige slijmproductie	12
5. Epitheel-naar-mesenchymale transitie	14
5.1 Oorzaak	14
5.2 Kenmerken	15
5.3 Mesenchym-naar-epitheel transitie	16
6. Rol van EMT bij astma en remodeling	17
7. Conclusie	18
Referenties	20

1. Inleiding

Iedereen doet het iedere dag minstens 12 keer per minuut en het is essentieel om te overleven. Toch hebben we het vaak niet in de gaten en gaat het geheel automatisch. Ademen. De ademhaling is zo geautomatiseerd dat het vaak als vanzelfsprekend beschouwd wordt en het pas wordt opgemerkt als er problemen ontstaan. Astma is een voorbeeld van een ziekte die een negatieve invloed heeft op de manier van ademen.

De lucht die je inademt en de longen die de zuurstof hieruit opnemen zijn essentieel om goed te kunnen functioneren. De ingeademde lucht gaat in de longen via de bronchiën naar de luchtblaasjes, die de zuurstof uit de lucht opnemen voor het lichaam. De bronchiën zijn aan de buitenkant omgeven door spiertjes die ontspannen bij het inademen en samentrekken bij het uitademen. Aan de binnenkant zijn de bronchiën bekleed met slijmvlies. Dit beschermt de longen tegen indringers van buiten en beschermt de luchtwegbekledende cellen, het epitheel, tegen schade. Het kan voor komen dat dit mechanisme wordt verstoord. Hierdoor hebben de indringers vrij baan naar de luchtweg en wordt de barrière functie van het epitheel en het slijmvlies verminderd.

De bronchiën zijn daarnaast overgevoelig voor bepaalde prikkels. Deze prikkels kunnen allergenen zijn zoals pollen en huisstofmijt, maar het kunnen ook specifieke prikkels zijn zoals rook en mist. In eerste instantie treedt er een overdreven afweerreactie op in de luchtwegen als deze in aanraking komen met een bepaald allergeen, hierdoor ontstaat er een ontsteking. Als gevolg van deze ontsteking zijn de luchtwegen gevoeliger voor specifieke prikkels. Dit komt doordat ontstekingscellen zoals eosinofielen en mestcellen hun mediators afgeven wanneer ze in aanraking komen met deze specifieke prikkels. Hierdoor trekken de gladde spiercellen om de bronchiën samen. Dit heet luchtweghyperreactiviteit. Tevens wordt er meer slijm aangemaakt, de doorgang wordt vernauwd en het wordt moeilijker voor de patiënt om adem te halen. Gelukkig zijn deze aanvallen tijdelijk en kan de patiënt hierna weer normaal ademen.¹

Door deze continue ontstokenheid van de bronchiën kunnen er ook veranderingen optreden in de structuur en de samenstelling van de wand van de luchtwegen. Er komen onder andere meer gladde spiercellen en bloedvaten bij in de luchtweg. Dit proces wordt remodeling genoemd. Tevens kunnen er veranderingen optreden in het epitheel van de luchtwegen, zo wordt het aantal cel-celcontacten verminderd en krijgen de cellen de capaciteit om te migreren.² De mogelijkheid om te migreren is van belang om de weefsels getroffen door schade, als gevolg van de afweerreactie, af te schermen van de buitenwereld. Dit beperkt de schade enigszins. Het vermoeden heerst dat het epitheel-naar-mesenchym (EMT) transitieproces hier een rol in heeft. Bij dit proces veranderen de epitheelcellen van de luchtwegen in mesenchymaalachtige cellen met expressie van andere eiwitten.² Epitheelcellen zijn de luchtwegbekledende cellen die de eerste verdedigingslinie vormen tegen de buitenwereld terwijl mesenchym een mix is van fibroblasten en collageenbundels waaruit verschillende soorten cellen zich kunnen ontwikkelen, zoals gladspierweefsel en endotheel.

Het is tot nu toe dus nog niet helemaal duidelijk wat het precieze mechanisme is achter de luchtwegremodeling bij astma. Deze scriptie zal proberen om de mechanismes die bekend zijn in kaart te brengen en de rol van EMT hierin uit te leggen. Eerst zal een uitleg volgen wat de ziekte astma precies inhoudt. Daarna zal er worden gekeken naar de veranderingen in het epitheel die optreden bij astmapatiënten, naar de remodeling en naar het EMT proces. Tenslotte zal de vraag worden gesteld of het EMT proces een rol speelt bij astma en remodeling. Beantwoording van deze vraag zou kunnen bijdragen aan het beter begrijpen van de luchtwegremodeling die optreedt bij astma en bij het ontwikkelen van eventuele behandelmethoden hiertegen.

2. Pathofysiologie van astma

2.1 Kenmerken van Astma

Astma is een chronische longziekte waarbij de bronchiën continu ontstoken zijn. Wereldwijd komt de ziekte steeds vaker voor bij zowel kinderen als volwassenen.³ In Nederland is de diagnose astma bij een half miljoen mensen vast gesteld¹ en wereldwijd is dit zelfs 300 miljoen.⁴ De symptomen van astma zijn onder andere vernauwing en prikkelbaar worden van de luchtwegen, niezen, overmatige slijmproductie en hoesten.⁵ Een ander kenmerk van astma is bronchiale hyperreactiviteit. De luchtwegen van de patiënten zijn dan hyperreactief voor bepaalde prikkels.

Deze prikkels kunnen allergenen zijn, zoals pollen en huisstofmijt bij allergische astma. Allergische astma wordt veroorzaakt door atopie, de aanleg om allergische hypersensitieve reacties te ontwikkelen en immunoglobuline (IgE) te produceren als reactie op de allergenen. Atopie komt vooral voor bij kinderen, slechts de helft van de volwassen astmapatiënten heeft hier last van.⁶ Behalve allergische astma zijn er ook nog drie andere varianten, namelijk intrinsieke astma, inspanningsastma en beroepsastma.¹ Allergische astma is echter de meest voorkomende variant, waar het meeste onderzoek naar is gedaan. In de rest van de scriptie zal vooral worden gefocust op allergische astma.

De hoofdoorzaak van astma is de ontsteking die optreedt na blootstelling aan een bepaalde prikkel. Als een astmapatiënt een allergeen inhaleert treedt er een overdreven afweerreactie op. Het epitheel herkent het allergeen en laat chemokines vrij, deze chemokines kunnen de T_H2 cellen van het immuunsysteem aantrekken. Onder normale omstandigheden zijn er al meer T_H2 cellen in de luchtwegen van astmapatiënten aanwezig, na de reactie op het allergeen worden dit er nog meer. De T_H2 cellen laten cytokines vrij zoals IL-4, IL-5 en IL-13, ook wordt het histamineproducerende antilichaam immunoglobuline (IgE) geproduceerd als reactie op het allergeen. Deze reacties zorgen ervoor dat de mestcellen geactiveerd worden en de eosinofielen worden aangetrokken waardoor deze hun inhoud vrijgeven. Hierdoor trekken de gladde spiercellen in de luchtwegen zich samen en krijgt de patiënt moeite met ademen, dit heet bronchoconstrictie. Deze reactie treedt zo vaak op dat de ontsteking chronisch wordt, zodat uiteindelijk het epitheel beschadigt, het basale membraan verdikt en de slijmvliezen opzwellen. Bij de chronische ontsteking spelen vooral eosinofielen een belangrijke rol, in tegenstelling tot de mestcellen die hier nauwelijks bij betrokken zijn. Na verloop van tijd kan de patiënt ook astma-aanvallen ontwikkelen als de luchtwegen in contact komen met specifieke stoffen, zoals rook, mist en koude lucht. Bij deze hyperreactiviteit treedt er geen ontsteking op, maar de mastcellen en eosinofielen die al aanwezig zijn door de chronische ontsteking laten dan hun inhoud vrij, als reactie op de specifieke stof. Dit heeft tijdelijke gladde spiercelconstrictie tot gevolg.

De symptomen bij astma hebben vaak een variabel en reversibel verloop, met symptoom vrije periodes gevolgd door periodes van ernstige symptomen.^{3 6} Ook kan de mate van astma onderling erg verschillen, zo bestaat er een ernstige variant en een milde variant. De symptomen van astma zijn het resultaat van een aantal processen, waaronder de contractie van de gladde spiercellen in de luchtwegen, luchtweginfectie, allergische reacties en luchtwegontsteking.³ De luchtwegontsteking is het gevolg van de allergische reactie die optreedt na blootstelling aan een allergeen. Om de diagnose astma vast te stellen wordt vaak gebruik gemaakt van het meten van de piek van uitademingsvolume (PEF) of het geforceerde uitademingsvolume in 1 seconde (FEV₁).³

2.2 Oorzaak

De precieze oorzaak van astma is nog niet helemaal duidelijk. De ziekte begint vaak bij kinderen, al kan het ook pas later optreden.³ Wel is er geconstateerd dat het in veel gevallen erfelijk is. Als een kind één ouder heeft die astmatisch of allergisch is, is de kans 50% dat dit kind ook aanleg heeft voor prikkelbare luchtwegen. De kans is ruim 70% als beide ouders astma of allergieën hebben. Een kind loopt slechts vijf tot tien procent kans om astma te ontwikkelen als geen van beide ouders astma of allergische aanleg heeft.¹

Naast de genetische aanleg heeft ook de omgeving een rol op het ontwikkelen van astma of een allergie.⁷ Een kind met aanleg voor astma en allergieën kan langzaam een allergie ontwikkelen als het regelmatig met allergenen in contact komt. Personen met een allergie hebben ook een grotere kans om astma te ontwikkelen.¹ Andere oorzaken dan de genetische aanleg zijn ook aan te wijzen. Kinderen waarvan de moeder rookte tijdens de zwangerschap en te vroeg geboren kinderen hebben vaker last van astma of allergieën. Een laag geboortegewicht¹ en zwaarlijvigheid lijken ook risicofactoren van astma.⁸ Bij beroepsastma is het vaak en lang inademen van chemische stoffen de oorzaak.¹ In een onderzoek is aangetoond dat de verdikking van het basale membraan en epitheel schade al waarneembaar is in jonge kinderen, een aantal jaren voordat astma zich openbaart.⁹

2.3 Behandeling

Om de acute symptomen van astma te behandelen wordt ook wel een kortwerkende β_2 -agonist geïnhaled, maar dit onderdrukt het ziekte proces echter niet.³ De huidige lange termijnbehandeling tegen astma bestaat onder andere uit toediening van corticosteroiden. Corticosteroiden staan erom bekend dat ze ontstekingsreacties remmen. Met deze therapie wordt dan ook beoogd de ontsteking die plaats vindt bij astmapatiënten te remmen. De structurele veranderingen die optreden in de luchtwegen, remodeling, worden met deze behandelingen echter niet geremd¹⁰ Daarom is het van belang om te begrijpen hoe deze structurele veranderingen ontstaan en wat de beste behandeling hier tegen is.

2.4 Rol van het epitheel bij de ontwikkeling van astma

Het epitheel bestaat uit de buitenste laag cellen die in contact komen met de buitenwereld. Ze beschermen de onderliggende cellen onder andere door een fysieke barrière te vormen. Deze fysieke barrière kan ontstaan door contacten tussen aan elkaar grenzende cellen, cel-celcontacten. Een eiwit dat zorgt voor deze cel-celcontacten is E-cadherine. Tevens zorgen de epitheliale slijmbekercellen voor bescherming door slijm te produceren. Het slijm in de luchtwegen beschermt onder normale omstandigheden het epitheel oppervlakte tegen schade en maakt het verwijderen van bacteriën en andere schadelijke deeltjes gemakkelijker.¹¹⁰

Bij de ziekte astma is de bescherming van het epitheel afgenomen. Dit komt onder andere doordat E-cadherine, wat voor de cel-celcontacten zorgt, is afgenomen bij astmapatiënten. Hierdoor vermindert de fysieke barrière die het epitheel vormt en kunnen allergenen doordringen tot het onderliggende weefsel. Dit zorgt ervoor dat er sneller een afweerreactie op kan treden, waardoor er ontstekingen kunnen ontstaan. Deze ontstekingen worden geregeld door de T_H2 cellen. T_H2 cellen scheiden onder andere het cytokine IL-13 uit dat de slijmbeker cellen vergroot, waardoor er meer slijm wordt aangemaakt. Hierdoor verandert tevens de morfologie van de epitheelcellaag, wat tot gevolg heeft dat de fysieke barrière nog verder afneemt.^{11,12} De ontstekingsfactoren hebben eveneens tot gevolg dat er structurele veranderingen optreden in het onderliggende weefsel zoals verhoging van het aantal gladde spiercellen en fibrose van het subepitheel. Dit proces wordt remodeling genoemd.

Het epitheel-naar-mesenchym transitie (EMT) proces is een proces wat mogelijk kan bijdragen aan de remodeling in astmapatiënten. Uit onderzoek is gebleken dat EMT E-cadherine in bronchiale

epitheelcellen kan verlagen en mesenchymale eiwitten kan verhogen. De verlaging van E-cadherine is ook waargenomen in het luchtwegepitheel van astmapatiënten. De grote vraag is nu of het EMT proces daadwerkelijk optreedt in de luchtwegen van astmapatiënten en of dit bijdraagt aan de remodeling en pathologie van astma. Om meer inzicht hierin te verkrijgen zal in deze scriptie eerst de functie van het epitheel en de veranderingen hierin bij astma worden besproken, daarna zal er worden gekeken naar de remodeling en EMT. Als laatste zal de rol van EMT bij astma en remodeling zoals nu bekend is aan bod komen.

3. Epitheel

3.1 Functie

De belangrijkste functie van het epitheel is om het interne milieu te beschermen tegen pathogenen, microben en andere schadelijke partikelen. Het epitheel vervult deze rol op verschillende manieren: door een fysieke barrière, slijmproductie en immuunreacties.¹³

Het eerste deel van de bescherming bestaat uit de fysieke barrière. De fysieke barrière wordt gevormd doordat de epitheelcellen aan elkaar gebonden zijn, waardoor pathogenen en microben het interne milieu niet kunnen binnen dringen. De zogeheten intercellulaire epitheel junctions onderhouden de epitheel barrière door cel-celcontacten tussen cellen te vormen. Onder deze intercellulaire epitheel junctions vallen de tight junctions, adherens junctions en de desmosomen. Adherens junctions verbinden de aan elkaar grenzende cellen met elkaar en initiëren de differentiatie van cellen door E-cadherine adhesies. Deze zitten vast aan het actine cytoskelet en aan het microtubule netwerk door verschillende catenines, zoals β -catenine. E-cadherine zorgt er ook voor dat andere junction complexen kunnen worden gevormd. Tight junctions worden gezien als de belangrijkste regulatoren van de permeabiliteit tussen cellen. Ze bestaan uit transmembraan eiwitten, junction adhesion molecules (JAM), occludines en claudines, die aan het cytoskelet vastzitten. Desmosomen bestaan uit niet-klassieke cadherines die adhesie verbindingen vormen tussen het cytoskelet filament van de epitheelcellen en de lamina propria.²

Veranderingen in de adhesie junctions zijn van groot belang nadat er schade in het epitheel is opgetreden. Hierdoor kunnen de epitheelcellen migreren en verspreiden om de schade tijdelijk te herstellen en kunnen ze tijdelijk overleven op een fibrine extracellulaire matrix, totdat het weefsel op de juiste manier hersteld is door gedifferentieerde epitheelcellen.¹⁴⁶ Schade aan het epitheel leidt tot de vrijgeving van veel factoren, waaronder transforming growth factor (TGF), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF) en cytokines, chemokines en proteases. Deze stimuleren de remodeling van de celadhesie junctions en migratie tijdens het weefselherstel. Tevens laten beschadigde en omliggende epitheelcellen verschillende FGFs vrij, zoals FGF-2, insulin-like growth factor-1 en TGF- β . De FGFs induceren proliferatie en differentiatie van fibroblasten in myofibroblasten en bevorderen hiermee het weefselherstel. De myofibroblasten hopen zich opeen en geven fibronectine en collageen matrix vrij om celmigratie en contractie op het gebied van schade mogelijk te maken.² Hierdoor wordt de schade die is ontstaan snel gedicht en wordt verdere blootstelling aan de buitenwereld voorkomen.

Het tweede deel van de bescherming wordt gevormd door de productie van slijm. Slijm wordt geproduceerd door een bepaald type epitheelcellen, namelijk de slijmbekercellen. Het slijm vangt als het ware de partikels uit de lucht op en maakt ze hierdoor onschadelijk. Het slijm met de partikels wordt verwijderd door de bovenste laag van het epitheel dat bedekt is met trilharen. Een beweging in deze cellen zorgt voor trilhaarbeweging wat het slijm kan verplaatsen naar de uitgang en het daarmee verwijdert.

Het derde deel van de bescherming wordt gevormd door de aangeboren immuunreacties die het epitheel kan opwekken. In het deel dat aan de omgeving wordt blootgesteld worden pattern recognition receptors (PRRs) tot expressie gebracht, zodat pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) uit microben snel gedetecteerd kunnen worden en er snel op gereageerd kan worden. Deze receptoren dienen er dus voor om gevaar van buitenaf te kunnen herkennen en hierop te reageren. Als deze PRRs geactiveerd worden, komen er verschillende cytokines, chemokines en antimicrobiële peptiden vrij. Deze cytokines en chemokines kunnen de immuuncellen en dendritische cellen aantrekken en activeren, waarna deze pathogenen en microben onschadelijk maken.¹⁵

3.2 Veranderingen bij astma

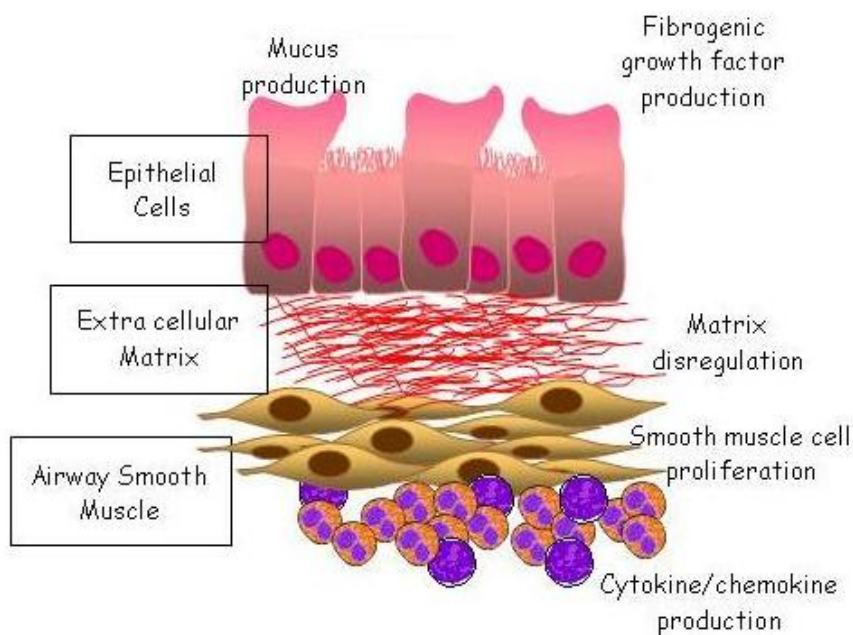
Bij de ziekte astma treden er veranderingen op in het epitheel. Deze veranderingen zijn onder andere het loslaten van het epitheel, verlies van trilhaarcellen en een verhoging van groeifactoren, cytokines en chemokines.^{16,17} Een aantal onderzoeken hebben ook uitgewezen dat de barrière functie van het epitheel verslechterd is in astmapatiënten, doordat de tight junctions van het epitheel en E-cadherine worden afgebroken en het herstel van het epitheel na schade minder wordt^{18 19}.

Er wordt gesuggereerd dat de ontwikkeling van astma vooral wordt veroorzaakt door gebreken in de epitheellaag waardoor de allergenen, micro-organismen en toxines vrij baan hebben naar het weefsel van de luchtweg.²⁰ Deze gebreken zouden het gevolg kunnen zijn van een verlaging van de hoeveelheid E-cadherine in de epitheelcellen. Hierdoor vermindert de vorming van cel-celcontacten en verandert de structuur van de epitheellaag. De schade in de epitheellaag in astmapatiënten is geassocieerd met een verminderd herstelproces, wat de ontstekings- en remodelingreacties in de onderliggende submucosa stimuleert, doordat microben vrij baan krijgen naar het onderliggende weefsel in de luchtweg. Hierdoor treden er ontstekingen op, die het remodelingsproces weer beïnvloeden. Ook omgevingsfactoren of mechanische stress dragen bij aan de schade aan het epitheel en de vrijlating van factoren uit het epitheel die bijdragen aan weefselremodeling.

Enkele van deze factoren zijn TGF- β en chemokines. Ze worden vrijgelaten uit het beschadigde of herstellende epitheel of als reactie op ontstekingsfactoren, zoals IL-13. Deze factoren een belangrijke rol in de ontwikkeling van de fibrose van de cellen in de subepitheellaag en de verhoogde gladde spiermassa. Hierdoor is de veronderstelling ontstaan dat astma ontstaat door een verstoring in de epitheel-mesenchym interacties.¹⁸ Mesenchymale cellen spelen een rol in de ontwikkeling van de luchtwegen en zijn geprogrammeerd om samen te werken met het epitheel. Dit wordt het epithelial-mesenchymal trophic unit (EMTU) genoemd. Onder normale omstandigheden communiceren het epitheel en het onderliggende mesenchym met elkaar door middel van cytokines en groeifactoren (TGF- β en EGF) om de groei en het herstel na schade te coördineren.²¹ Bij astma is deze communicatie verstoord doordat de mesenchymale cellen in myofibroblasten zijn gedifferentieerd die cytokines produceren de remodeling bevorderen.²² De gedachte is ontstaan dat ook de epitheelcellen in myofibroblasten zijn gedifferentieerd door het EMT proces, zodat de remodeling nog meer wordt gestimuleerd. Recent is aangetoond dat epitheel-naar-mesenchym transitie kan ontstaan in het luchtweg epitheel van muizen blootgesteld aan allergenen, terwijl deze transitie normaal alleen betrokken is bij de ontwikkeling van de luchtwegen.^{23,24} De vraag is nu of de ziekte astma daadwerkelijk ontstaat door een verstoring in de epitheel-mesenchym interacties en daarmee door het EMT proces.

4. Remodeling

Remodeling staat voor veranderingen in de normale samenstelling en structurele organisatie van weefsels. Hierbij zijn ontstekingen geassocieerd met cellulaire en structurele veranderingen die leiden tot verdikking van de wand van de luchtwegen. Deze verdikking heeft tot gevolg dat de luchtwegen vernauwen en de longen minder lucht krijgen. Remodeling bij astmapatiënten is de oorzaak van veel pathofysiologische veranderingen. Er treden onder andere veranderingen op in het epitheel, er ontstaan meer gladde spiercellen en er is een verhoogd aantal geactiveerde fibroblasten en myofibroblasten. Ook ontstaan er meer bloedvaten (angiogenese) en is er een overmatige slijmsecretie¹⁶(Figuur 1).



Figuur 1.²⁵ Veranderingen bij luchtwegremodeling.

Bij remodeling treden er cellulaire veranderingen op in de luchtwegen van astmapatiënten, dit is waarschijnlijk het gevolg van de chronische ontsteking die hierbij aanwezig is. Een oorzaak van deze veranderingen is de overgang van fibroblasten in myofibroblasten. De myofibroblasten geven ontstekingsmediatoren en extracellulaire matrix (ECM) eiwitten, zoals fibronectine, tenascin en de collagenen I, III en V vrij, waardoor de expressie van deze eiwitten verhoogd is in de luchtwegen van astmapatiënten.² De synthese en degradatie van deze ECM wordt geregeld door matrix metalloproteinases (MMPs) en tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Cytokine TGF- β speelt in dit verhaal een belangrijke rol. Het stimuleert de omzetting van fibroblasten in myofibroblasten en verhoogd de expressie van zowel MMPs als TIMPs.¹⁶ Hierdoor neemt het basaalmembraan in omvang toe en wordt de migratiecapaciteit van de epitheelcellen verhoogd. Uit onderzoek is een verhoging waargenomen van TGF- β in astmapatiënten in vergelijking met gezonde subjecten.²³ Dit komt doordat het beschadigde epitheel in de luchtwegen van astmapatiënten TGF- β kan aanmaken en hierdoor de remodeling verder kan bevorderen.¹⁶

4.1 Ontstaan van remodeling

Het vermoeden heerst dat ontsteking de drijvende kracht is achter de meeste kenmerken van luchtwegremodeling. Meerdere cytokines, chemokines en groeifactoren van ontstekingscellen en structurele cellen in de luchtwegen zijn verantwoordelijk voor de remodeling. Het histamine producerende antilichaam immunoglobuline (IgE) en mest cellen zijn betrokken bij de acute reactie en eosinofielen in de late reactie. T-cellen, voornamelijk T_H2 cellen, regelen deze reacties door de productie van cytokines, zoals IL-4, IL-5, IL-9 en IL-13.^{26 27 28} Deze cytokines zijn essentieel voor IgE synthese, chemokine productie, luchtweg eosinofilie en gladde spiercel proliferatie (hyperplasie).^{29 12} De cytokines dragen ook bij aan de subepitheliale fibrose en aan de overmatige slijmproductie door de epitheliale slijmbekercellen. Deze veranderingen zijn ook kenmerkend voor de remodeling, wat het vermoeden ondersteunt dat de ontsteking ten grondslag ligt aan de remodeling. Uit een onderzoek van Holgate et al. is echter gebleken dat de structurele veranderingen van de remodeling al ontstaan voordat het ontstekingsproces plaats vindt.³⁰ Dit wekt de suggestie dat er een ander mechanisme zou moeten bestaan die betrokken is bij de ontwikkeling van de remodeling. Dit mechanisme zou het EMT proces kunnen zijn.

4.2 Fibrose van het subepitheel

Een kenmerk van astma is de verdikking van het basaalmembraan. Het basaalmembraan van het epitheel bestaat uit twee lagen: de basale lamina en de lamina reticularis. Als er wordt gesproken over verdikking van het basaalmembraan is het gebied net onder de lamina reticularis in omvang toegenomen¹¹ In de buurt van het basaalmembraan liggen fibroblasten. Fibroblasten zijn grote, platte cellen die in een omgeving met veel ontstekingen zoals de astmatische luchtwegen, worden geactiveerd en differentiëren in myofibroblasten.¹⁶ Dit zijn gespecialiseerde cellen met kenmerken van zowel fibroblasten als monocytten. Het fenotype ligt tussen dat van fibroblasten en gladde spiercellen. Ze brengen alpha-smooth muscle actin (α -SMA) tot expressie en kunnen chemokines vrijgeven die de levensduur van eosinofielen kunnen verlengen.¹¹ Ook kunnen de myofibroblasten proinflammatoire mediators en extracellulaire matrix (ECM) eiwitten vrijgeven.

De ECM eiwitten vormen een netwerk van collageen en niet-collagene structuren om de cellen in de luchtwegen en hebben een invloed op het celgedrag, zoals migratie, differentiatie en proliferatie.³¹ De belangrijkste ECM elementen zijn collagenen, fibronectine, bepaalde matrix metalloproteinases (MMPs) en tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), de inhibitors van MMPs.¹⁶ Het ECM deel van de luchtwegwand is dynamisch en wordt geregeld door synthese en degradatie. MMPs reguleren de degradatie van de extracellulaire matrix en TIMPs reguleren de synthese hiervan. Veranderingen in de degradatie en synthese zouden kunnen leiden tot een verbeterde migratiecapaciteit van de epitheelcellen en zouden kunnen bijdragen aan de remodeling. In astma zijn de meest belangrijke leden van deze families MMP-9 en TIMP-1.

Onderzoeken op astmapatiënten hebben laten zien dat er een verhoogde productie van zowel MMP-9 als TIMP-1 aanwezig is. De ratio van MMP-9 en TIMP-1 is lager in controle groepen en vertoont een correlatie met de mate van luchtwegobstructie veroorzaakt door remodeling. Dit zou verklaard kunnen worden doordat een verhoging van TIMP-1 kan leiden tot verdikking van het basaalmembraan,^{11 32} een onderdeel van het remodelingproces. MMP-9 is verantwoordelijk voor de degradatie van de ECM, dus een verhoging hierin kan leiden tot een verhoging van de migratiecapaciteit van een epitheelcel. Waarschijnlijk zijn cellen die het EMT proces hebben ondergaan de belangrijkste bron van MMP-9 in de astmatische luchtwegen. Een verandering in de balans tussen TIMPs en MMPs kan ook leiden tot fibrose. De fibrose heeft tot gevolg dat de structuur in de luchtwegen wordt veranderd en dat de luchtwegwand abnormale eigenschappen krijgt. Als in astmapatiënten fibroblasten continu worden geactiveerd kan dit leiden tot fibrose van het subepitheel.³³

Het lijkt er dus op dat een verhoging van de fibrose van het subepitheel en de verdikking van het basaalmembraan belangrijke kenmerken zijn van het remodelingproces. Verschillende onderzoeken

hebben echter aangetoond dat er zowel patiënten zijn met ernstige astma die geen verhoogde fibrose hebben in het subepitheel als dat er mensen zijn zonder astma met een verhoogde fibrose van het subepitheel.³⁴ Er is ook gesuggereerd dat fibrose van het subepitheel een vroeg kenmerk is voor astma bij kinderen.³⁵ Dit zou er op kunnen wijzen dat fibrose van het subepitheel toch niet zo kenmerkend is voor het remodelingproces als wordt gedacht. Fibrose van het subepitheel zou hierdoor een verstoorde epitheel-mesenchym signalering kunnen vertegenwoordigen en niet de directe respons op een ontsteking, aangezien personen zonder astma geen ontstekingen hebben in de luchtwegen.³⁶ ³⁰ Bij deze personen zou er wel een verstoorde epitheel-mesenchym signalering aanwezig kunnen zijn, dat de verhoging van de fibrose van het subepitheel zou verklaren. De patiënten met ernstige astma hebben wel ontstekingen, maar hier treedt geen fibrose van het subepitheel op wat deze bewering verder ondersteunt. Ook de rol van de verdikking van het basaalmembraan bij de remodelingproces wordt in twijfel gebracht. Er is aangetoond dat de ernstigheid van de symptomen, de leeftijd of lengte van de astmaklachten is niet per se gerelateerd is aan de mate van verdikking van het basaal membraan. De verdikking van het basaal membraan heeft wel een negatieve correlatie met %FEV1 en een dosis van methacholine. Methacholine is een stofje dat kan leiden tot luchtwegvernauwing, wat wordt gebruikt om bronchiale hyperreactiviteit aan te tonen. De verdikking van het basaalmembraan heeft dus tot gevolg dat de patiënt minder kan ademen en meer luchtwegvernauwing heeft dan personen zonder deze verdikking van het basaalmembraan. Andere onderzoeken hebben aangetoond dat de hoeveelheid collageen depositie gecorreleerd is met de ernstigheid van de astma.¹¹

4.3 Verhoogde gladde spiercelmassa

Gladde spiercellen zijn belangrijke structuurcellen in de bronchiën. Remodeling van deze cellen wordt dan ook gezien als één van de hoofdoorzaken van luchtwegobstructie door bronchoconstrictie. Hierbij trekken de gladde spiercellen in de bronchiën zich samen waardoor de luchtweg zich vernauwd. In astmapatiënten is de hoeveelheid gladde spiercellen sterk toegenomen door celproliferatie (hyperplasie) en celvergroting (hypertrofie). Hyperplasie vindt voornamelijk plaats in de centrale luchtwegen, waar hypertrofie in de gehele luchtweg plaats vindt. Ook de migratie van de gladde spiercellen richting het epitheel is een bijdragende factor. Gladde spiercellen spelen tevens een rol in het ontstekings- en remodelingproces. In de gladde spiercellaag kunnen net als in het basaalmembraan veranderingen optreden in de ECM compositie. Dit kan zelfs verkorting van de gladde spiercelbundels voorkomen en hiermee de ernstige luchtwegvernauwing beperken.³⁷

4.4 Angiogenese

In astmapatiënten is er een abnormale verhoging in het aantal en de grootte van de microvaten in het bronchiale weefsel in de luchtwegen. Een verstoorde balans tussen VEGF (vascular endothelial growth factor) en angiopoietin-1 is hierbij betrokken. VEGF kan worden aangemaakt door het epitheel en verhoogt de permeabiliteit van deze abnormale bloedvaten, wat leidt tot dilatatie en oedeem. Dit heeft tot gevolg dat de luchtwegen vernauwen. Behalve dat deze vaten voedingsstoffen brengen aan de luchtwegen, zijn ze ook de bron van ontstekingscellen en cytokines.³⁸

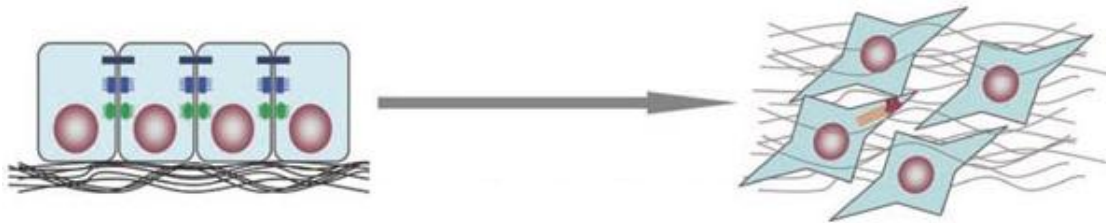
4.5 Overmatige slijmproductie:

Overmatige slijmproductie is een belangrijk kenmerk van astma. Slijmbekercellen, een bepaald type epitheelcellen, en slijmklieren zijn de belangrijkste bron van mucin glycoproteïns (MUCs). MUC5AC genexpressie lijkt hoger te zijn in de luchtwegen van astmapatiënten dan van gezonde personen. Onderzoek heeft uitgewezen dat er een verhoogde expressie van de epidermal growth factor receptor (EGFR) optreedt in de luchtweg epitheelcellen van astmapatiënten. Zoals de naam al zegt komt de EGFR voor op het epitheel en de ligand (EGF) hiervoor wordt door het epitheel aangemaakt. EGFR activatie kan leiden tot mucin MUC5AC synthese en slijmbekercelproductie in menselijke

bronchiale cellen *in vivo* en *in vitro*, waardoor dit een belangrijke rol kan spelen bij de overmatige slijmproductie.

5. Epitheel-naar-mesenchym transitie

EMT staat voor epitheel-naar-mesenchym transitie. Bij dit proces veranderen epitheelcellen in cellen met een mesenchym fenotype, zoals myofibroblasten. Mesenchymale cellen hebben onder andere minder cel-celcontacten en hierdoor meer migratiecapaciteit³⁹ (figuur 2). Veranderingen vinden ook plaats in de expressie van eiwitten. Er is een toename in eiwitten kenmerkend voor mesenchymcellen, zoals fibronectine en vimentine, en er is een afname in eiwitten kenmerkend voor epitheelcellen zoals E-cadherine en cytokeratines. Er zijn verschillende soorten EMT te onderscheiden; type I, II en III. Type I EMT is betrokken bij de ontwikkeling van het mesoderm uit het epitheel tijdens de gastrulatie en bij de gecoördineerde organogenese van weefsels zoals het hart.⁴⁰ Type II EMT zorgt voor wondsluiting en weefselregeneratie als reactie op epitheelstress of weefselchade. De epitheelcellen die EMT hebben ondergaan, zorgen voor een snelle tijdelijke sluiting van de wond, waarna de wond goed hersteld kan worden. Het oncogene type III EMT-proces maakt het mogelijk dat de migratiecapaciteit van malignante epitheelcellen wordt verhoogd. Hierdoor kan er tumorinvasie ontstaan en metastase.⁴¹ Bij luchtwegremodeling is vermoedelijk type II EMT betrokken.²



Figuur 2.⁴² EMT proces. Epitheelcellen veranderen tijdens het EMT proces in mesenchymcellen waarbij het aantal cel-celcontacten afneemt en de cel epitheelmarkers verliest en mesenchymale markers verwerft.

5.1 Oorzaak

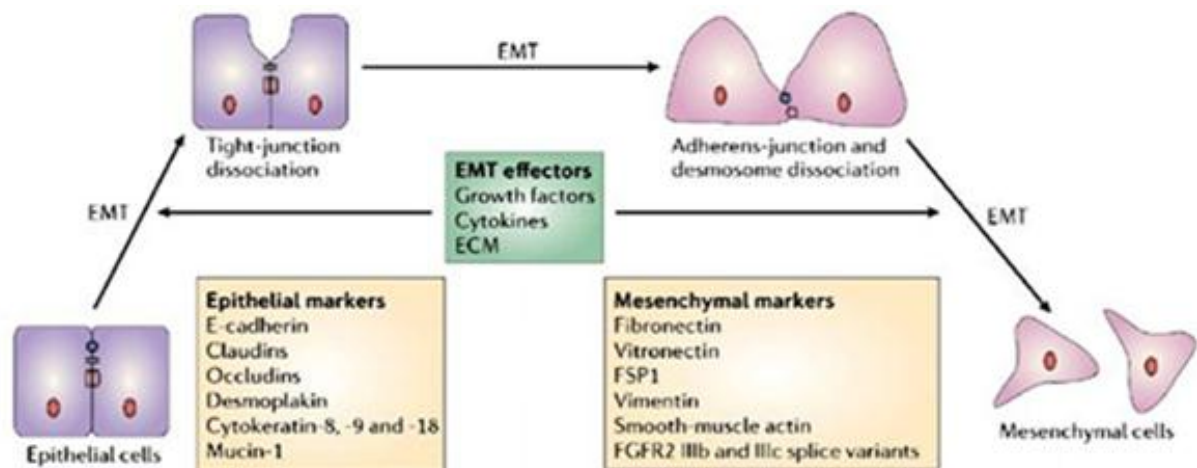
Het EMT proces kan worden geïnduceerd door een complex netwerk van extracellulaire signalen, zoals extracellulaire matrix componenten (collageen en hyaluronisch zuur) en oplosbare groeifactoren (TGF, FGF, EGF).⁴³ De werking van TGF- β (tumor growth factor) op het EMT proces is het meest bestudeerde van al deze signalen. Van TGF- β is al bekend dat het een duidelijke rol speelt in de remodeling van de luchtwegen⁴⁴. Het induceert echter ook EMT door SMAD2/3 afhankelijke mechanismen, waaronder de verhoging van Snail1 (SNA1) en SNA2, die de transcriptie van E-cadherine onderdrukken.⁴⁵ Vooral de regulatie van de SNA1 eiwitstabiliteit en de lokalisatie van cellen door verschillende fosforylaties door glycogen-synthase-kinase-3b (GSK3B) is belangrijk voor de veranderingen die optreden bij EMT, na stimulatie met TGF- β .⁴⁶

TGF- β is een cytokine wat de productie van de extracellulaire matrix stimuleert. Het wordt gesynthetiseerd door onder andere epitheelcellen, macrofagen, eosinofielen, lymfocyten en fibroblasten. TGF- β_1 mRNA is verhoogd in patiënten met matige of ernstige astma en de expressie van dit cytokine is direct gerelateerd aan de mate van fibrose van het subepitheel.⁴⁷ Smad 7 is een eiwit met een remmend karakter tegen intracellulaire signaal transductie van TGF- β en is een modulator van TGF- β acties. Hierdoor zou gesteld kunnen worden dat de expressie van Smad 7 betrokken is bij de progressie van de verdikking van het basaalmembraan.⁴⁸

5.2 Kenmerken

Veel EMT inducerende routes grijpen in op het E-cadherine gen. Dit gen is belangrijk voor het fenotype van het epitheel en de functie hiervan. E-cadherine is een celadhesie eiwit, verantwoordelijk is voor de cel-celcontacten tussen de cellen.³⁹ Het belangrijkste kenmerk van het EMT proces is de afbraak van de cel-celcontacten en daarmee de verlaging van E-cadherine. TGF- β_1 verlaagd E-cadherine door de stimulatie van SNA1 en SNA2.³⁹ Door deze verlaging van E-cadherine komen de β -catenines die E-cadherine verbinden met het actineskelet vrij. De β -catenines kunnen dan gerecycled worden naar het celmembraan of in het cytosol terecht komen⁴⁹, waar het snel gedegeerd kan worden door glycogen synthase kinase 3-beta (GSK-3 β).³⁹ De activatie van onder andere TGF- β en EGFR kan GSK-3 β echter inactiveren.⁵⁰ Hierdoor kan het vrije β -catenine naar de nucleus transloceren, waar het de transcriptie van verschillende belangrijke eiwitten betrokken bij remodeling, zoals MMPs en EGFR, kan induceren.³⁹ Ook kan de vrije β -catenine slijmbekercel hyperplasie tot gevolg hebben⁵¹ en kan het SNA1 en SNA2 activeren, waardoor E-cadherine nog meer verlaagd.⁵²

De afbraak van epitheel adhesie eiwitten is echter niet de enige verandering die optreedt na EMT. Er zijn eveneens mesenchymale eigenschappen verworven door de epitheelcellen. Onder deze mesenchymale eigenschappen vallen onder andere de expressie van de eiwitten vimentine, FSP-1 (fibroblast-specific protein-1), EDA-fibronectine en α -SMA. Het eiwit α -SMA is een typische myofibroblast marker, die pas later tot expressie komt als de epitheelcel een myofibroblast is geworden. Bij het EMT proces wordt een epitheelcel eerst mesenchymaal en daarna myofibroblast. Vimentine en FSP-1 zijn markers om het onderscheid te maken tussen volledig opgetreden EMT waar de cel een myofibroblast is geworden of gedeeltelijke EMT waar de transitie naar mesenchymale cel nog bezig is.⁵³ EDA-fibronectine is een specifieke marker voor fibroblasten, myofibroblasten en gladde spiercellen. Andere belangrijke mesenchymale markers zijn MMP-2 en MMP-9. Deze verhogen de migratiemogelijkheid van de cellen door de extracellulaire matrix te knippen, waardoor de cellen gemakkelijker kunnen bewegen.² Als epitheelcellen worden blootgesteld aan TGF- β wordt de cel een langwerpige fibroblastachtige cel, die veel van deze mesenchymale markers tot expressie brengt⁴⁴ (figuur 3).



Figuur 3.⁵⁴ Markers. Na het EMT proces verandert de eiwitexpressie van de cel. Links zijn de epitheelcellen te zien met o.a. de markers E-cadherine en occludin. Na de EMT, rechts, worden o.a. fibronectine en vimentine tot expressie gebracht. EMT kan worden veroorzaakt door groeifactoren, cytokines en ECM.

5.3 Mesenchym-naar-epitheel transitie

Het doel van het EMT proces is dus het bevorderen van het wondherstel. Dit doet het door epitheelcellen om te zetten in cellen met een mesenchymaal fenotype die gemakkelijk kunnen migreren en hierdoor de wond kunnen dichten. De wond is dan echter nog niet helemaal genezen. De uiteindelijke bedoeling is om van de laag die gevormd is weer een functionele en gedifferentieerde epitheellaag te maken. Hiervoor zouden de mesenchymale cellen weer omgezet moeten worden in epitheelcellen, dit kan door middel van een proces genaamd mesenchym-naar-epitheel transitie (MET). Een stof dat mogelijk het MET proces kan stimuleren is bone morphogenesis protein-7.

Onderdeel van de TGF- β familie zijn de bone morphogenesis proteins (BMPs). Onderzoek heeft uitgewezen dat TGF-geïnduceerde EMT geremd kan worden in de nier en het hart met BMP-7 door middel van Smad1, Smad5 en Smad7.^{55 56} In de epitheelcellen van de luchtweg remt BMP-7 de TGF geïnduceerde EMT echter niet.⁴⁵ Dit suggereert dat BMP-7 celspecifieke functies heeft, die de epitheelcellen in de luchtwegen niet hebben. Dit kan verklaard worden doordat in de nier, waar BMP-7 wel werkt, de epitheelweefsels afgeleid zijn van het mesoderm door mesenchym-naar-epitheel transitie (MET), het tegenovergestelde proces van EMT.⁵⁷ In de luchtwegen is het epitheel niet afkomstig van het MET proces. Hoewel BMP-7 betrokken is bij het remmen van het EMT proces in de nieren en het hart, is familielid BMP-4 betrokken bij het induceren van EMT in de luchtwegen. In de aanwezigheid van BMP-4 verlagen de adherens junctions eiwitten, de cellen krijgen meer motiliteit en er is meer genexpressie van collageen, fibronectine. Een mogelijke verklaring waarom BMP-4 wel invloed heeft op de epitheelcellen van de luchtwegen is doordat BMP-4 betrokken is bij de morfogenese en epitheeldifferentiatie in de ontwikkelende longen.⁵⁸

6. Rol van EMT bij astma en remodeling

Het is bekend dat remodeling bij astmapatiënten optreedt, maar of hier een rol voor het EMT-proces is weggelegd is nog niet helemaal duidelijk. Er vindt steeds meer onderzoek plaats om de relatie tussen deze twee vast te stellen.

Een aanwijzing dat het EMT proces optreedt bij astma kan gevonden worden in het feit dat niet alle cellen in EMT gaan na blootstelling aan TGF- β . Dit geldt alleen voor de basale epitheelcellen die normaal gesproken cytokeratine-5 en p63 tot expressie brengen en niet voor trilhaarcellen die cytokeratine-18 en/of MUC5AC tot expressie brengen. Er wordt gedacht dat deze basale cellen, die de onderste laag vormen van het epitheel, de voorlopers zijn van alle epitheelcellen in de luchtwegen. Hierdoor zouden ze meer plasticiteit en minder gedifferentieerd zijn dan andere cellen, door het ontbreken van het eiwit E-cadherine wat voor de cel-celcontacten zorgt. Dit zou kunnen bijdragen aan het vatbaar zijn voor een herprogrammingproces zoals EMT. Aangezien de hoeveelheid basale cellen is verhoogd bij de remodeling in astmapatiënten⁵⁹ zou gezegd kunnen worden dat de epitheelcellen in de luchtwegen bij astmapatiënten sneller in EMT gaan dan gezonde personen na contact met een prikkel, zoals een allergeen. Tevens zou dit betekenen dat EMT een belangrijke rol heeft bij de remodeling van de luchtwegen.

Een kenmerk van astma en remodeling is het verlies van de cel-celcontacten in het epitheel van de luchtwegen. Onderzoek *in vitro* heeft uitgewezen dat allergenen zoals huisstofmijt (HDM), histamine en pollen epitheel cel-celcontacten kunnen afbreken. HDM is een van de meest voorkomende allergenen betrokken bij allergische astma, in een aantal onderzoeken is dan ook de nadruk gelegd op de gevolgen van dit allergeen. Er is gebleken dat HDM de hoeveelheid E-cadherine en occludin kan verlagen in de bronchiale epitheel cellijn 16HBE door EGF receptor afhankelijke mechanismen wanneer het heeft blootgestaan aan TGF. HDM in combinatie met TGF induceert ook de mesenchymale markers vimentine en fibronectine in epitheelcellen. Het EMT proces verlaagt de hoeveelheid E-cadherine en verhoogt de mesenchymale markers. Er is gebleken dat de blootstelling aan HDM de epitheelmarkers kan afbreken, net zoals dat het geval is bij het EMT proces geïnduceerd door TGF- β . Dit impliceert dat het EMT proces zou kunnen plaats vinden in patiënten met allergische astma met overgevoeligheid voor huisstofmijt.^{24,45}

Onderzoek naar EMT door gebruik te maken van huisstofmijt is ook *in vivo* bij muizen gedaan.²³ Om de veranderingen en migratie van het epitheel bij deze muizen aan te tonen, zijn eerst een aantal stappen uitgevoerd waardoor de epitheelcellen permanent gemarkeerd waren door het gen LacZ. Door chronische blootstelling aan HDM werd bij deze muizen allergische astma geïnduceerd. Er is gerapporteerd dat deze blootstelling heeft geleid tot een verhoging van mesenchymale markers, waaronder collageen I, α -SMA en vimentine in het epitheel van de luchtwegen. De expressie van TGF in de epitheelcellen werd eveneens verhoogd na de blootstelling aan het allergeen. Door stimulatie met TGF- β werd de gefosforyleerde Smad3 en SNA1 expressie in de kern van de epitheelcellen verhoogd.⁴⁵ SNA1 is een inhibitor van het celadhesie eiwit E-cadherine, wat een verklaring geeft voor het feit waarom E-cadherine is verlaagd. De migratiecapaciteit van de epitheelcellen werd eveneens verhoogd, waarna de epitheelcellen via het subepitheel naar de gladde spiercelbundels konden migreren. Dit is aangetoond door kleuringen te verrichten op gladde spiercelsecties, die aantoonde dat er cellen aanwezig waren met het LacZ gen eraan. Al deze kenmerken komen overeen met wat er kan gebeuren als het EMT proces op zou treden, zoals *in vitro* is aangetoond.⁶⁰ Aangezien de hoeveelheid gladde spiercellen is toegenomen bij het remodelingsproces versterkt dit de suggestie dat EMT een rol heeft in het remodelingsproces bij astma. Ook zou gesteld kunnen worden dat omgevingsallergenen EMT routes in de luchtwegen van astmapatiënten.²

7. Conclusie

Het luchtweg epitheel speelt een belangrijke rol in de pathologie van astma, omdat het naast dat het een barrière functie heeft, de bron is van veel cytokines, chemokines en groeifactoren, die bijdragen aan de ontstekingsreactie en de remodeling. Het vermoeden heerst dat schade bij astmapatiënten aan het epitheel van de luchtwegen bijdraagt aan een verkeerd herstelproces van de longen, wat remodeling tot gevolg heeft. Hierdoor veranderen de structuur en samenstelling van het weefsel, waardoor de luchtwegen vernauwen. Tot voor kort werd gedacht dat de remodeling het gevolg was van de ontsteking die optreedt bij astma. Dit punt werd weerlegd doordat de behandeling van ontstekingsremmende corticosteroïden de remodeling niet kan voorkomen of ongedaan kan maken. Ook is aangetoond dat de structurele veranderingen van de remodeling al optreden voor het ontstekingsproces.³⁰ Hierdoor wordt steeds vaker de suggestie gewekt dat het EMT proces hierbij een rol zou kunnen spelen. Uit de *in vitro* data zijn veel belovende resultaten gekomen die aantonen dat het EMT proces wel degelijk zou kunnen optreden in bronchiale epitheelcellen door stimulatie met TGF- β . Er zijn echter weinig studies gedaan *in vivo* om onomstotelijk aan te tonen dat dit proces optreedt in astmapatiënten. Zo zou er een remmer van het EMT-proces ontwikkeld kunnen worden en in muizen kunnen worden getest, om aan te tonen of het remodelingsproces ook optreedt zonder de bijdrage van EMT.

In de *in vitro* onderzoeken is aangetoond dat de hoeveelheid E-cadherine in de epitheelcellen van de luchtwegen is verminderd na stimulatie met TGF- β en dat eveneens de expressie van andere junction eiwitten is afgenomen. De verlaging van E-cadherine is een belangrijk kenmerk van EMT en deze verlaging is tevens gevonden in het luchtwegepitheel van astmapatiënten. De cellen zullen hierdoor minder cel-celcontacten hebben en mogelijk een mesenchymaal fenotype kunnen ontwikkelen. Mesenchymale eiwitten worden geleidelijk verworven door de epitheelcellen in de luchtwegen na stimulatie met TGF- β en de migratiecapaciteit neemt toe. De epitheelcellen migreren naar het subepitheel van de grote luchtwegen, waarna ze zich in de gladde spiercelbundels begeven. Dit versterkt de suggestie dat EMT bijdraagt aan remodeling, aangezien bij remodeling het aantal gladde spiercellen toeneemt.

Stimulatie met het allergeen huisstofmijt in muizen bleek te leiden tot een verhoging van TGF- β_1 en tot een verlaging van de epitheelmarkers E-cadherine en occludin. Ook is er een verhoging waarneembaar van de mesenchymale markers vimentine, α -SMA en pro-collagen I en van de E-cadherine inhibitor SNA1. Bij deze muizen is echter een allergische reactie geïnduceerd door middel van chronische blootstelling aan huisstofmijt. De astmatische variant die hier is opgewekt is allergische astma, er zal meer onderzoek moeten plaats vinden om vast te stellen dat deze resultaten ook optreden bij andere astma varianten. Er zal tevens onderzoek gedaan moeten worden om aan te tonen dat dit proces bij menselijke subjecten met astma plaats vindt. Dit aangezien menselijke subjecten, niet zoals de muizen in het experiment, onder chronische blootstelling staan van het allergeen. Er zou onderzoek gedaan kunnen worden naar de sporadische blootstelling aan huisstofmijt om aan te tonen dat dan nog steeds EMT optreedt. Vervolgens zou er bij *in vivo* onderzoek ook getest kunnen worden op andere mesenchymale markers, aangezien vimentine en FSP-1 behalve op epitheelcellen ook op mononucleaire cellen en endotheelcellen voor kunnen komen. Zo is dus niet met zekerheid te zeggen of het een epitheelcel is die deze markers tot expressie brengt of dat het een ander celtype is.

Aangezien TGF- β significant is verhoogd in de longen na blootstelling aan het allergeen, zou hier de conclusie uit kunnen luiden dat TGF- β een belangrijke stimulator is van EMT in HDM geïnduceerde luchtwegontsteking. Smad3 en SNA1 waren aanwezig, wat tot de conclusie zou kunnen leiden dat SNA1-Smad3/4 repressor complexen betrokken zijn in het stimuleren van EMT.

De vraag aan het begin van deze scriptie was of EMT een rol heeft bij astma. Dit is echter nog niet met zekerheid te zeggen. Er komen wel steeds meer aanwijzingen dat EMT betrokken is bij de remodeling in astma. Zo is aangetoond dat de eiwitten die verhoogd zijn bij remodeling, zoals

fibronectine en tenascin, ook verhoogd kunnen worden door het EMT proces. Verder verlaagd EMT E-cadherine, een verlaging die ook gevonden wordt in de luchtwegen van astmapatiënten die remodeling hebben ondergaan. Uit het onderzoek van Johnson et al. is naar voren gekomen dat epitheelcellen in de luchtwegen wel degelijk mesenchymale eigenschappen kunnen verwerven.²³ Het is echter nog niet helemaal duidelijk of de verhoging van het aantal myofibroblasten zoals deze gezien wordt bij astma, volledig wordt veroorzaakt door het EMT proces, aangezien de duidelijke bijdrage van het EMT proces aan het aantal myofibroblasten pas in een latere fase van de ziekte te zien was.

Naast het feit dat er nog veel vragen beantwoord moeten worden over het EMT proces moet ook het precieze mechanisme van remodeling wat verder uitgediept worden. Als het duidelijk is welke mechanismen op welke manier bijdragen aan de ziekte astma, kan hier uiteindelijk een goede behandelingsmethode uitkomen die de schadelijke mechanismen tegen gaat. Het is nog niet met zekerheid te zeggen of bijvoorbeeld het EMT proces de astma alleen maar verergerd of dat het een soort feedbacksysteem van het lichaam is, waardoor meer schade beperkt wordt. Als dit allemaal duidelijk is, kan er een goede behandeling tegen deze ziekte worden gevonden. Mocht het EMT proces astma daadwerkelijk verslechteren, zou bijvoorbeeld gedacht kunnen worden aan het ontwikkelen van behandelingen die het EMT proces bevorderen, zodat het EMT proces wordt omgedraaid. Door een goede behandeling te ontwikkelen zullen astmapatiënten minder last hebben van de symptomen en zal het leven voor hen er een stuk zorgelozer uit gaan zien.⁶¹

Referenties

1. Nederlands Astma Fonds. Amersfoort, nederland www.astmafonds.nl. .
2. Hackett T. Epithelial–mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2012;12(1):53-59.
3. Edwards MR, Bartlett NW, Hussell T, Openshaw P, Johnston SL. The microbiology of asthma. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(7):459-471.
4. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: Executive summary of the GINA dissemination committee report. *Allergy*. 2004;59(5):469-478.
5. Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):176-183.
6. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med*. 2012;18(5):684-692.
7. Holt EW, Theall KP, Rabito FA. Individual, housing, and neighborhood correlates of asthma among young urban children. *J Urban Health*. 2012.
8. Kwon JW, Kim SH, Kim TB, et al. Airway hyperresponsiveness is negatively associated with obesity or overweight status in patients with asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;159(2):187-193.
9. Barbato A, Turato G, Baraldo S, et al. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(9):975-981.
10. Chakir J, Shannon J, Molet S, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(6):1293-1298.
11. Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int*. 2007;56(4):331-340.
12. Afshar R, Medoff BD, Luster AD. Allergic asthma: A tale of many T cells. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(12):1847-1857.
13. Xiao C, Puddicombe SM, Field S, et al. Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(3):549-56.e1-12.
14. Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;298(6):L715-31.
15. Lambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity*. 2009;31(3):412-424.
16. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(3):451-62; quiz 463-4.
17. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(2):405-410.
18. Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(6):1233-44; quiz 1245-6.
19. Hamilton LM, Puddicombe SM, Dearman RJ, et al. Altered protein tyrosine phosphorylation in asthmatic bronchial epithelium. *Eur Respir J*. 2005;25(6):978-985.
20. Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int*. 2008;57(1):1-10.
21. Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(2 Pt 1):193-204.
22. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*. 2002;418(6896):426-430.
23. Johnson JR, Roos A, Berg T, Nord M, Fuxe J. Chronic respiratory aeroallergen exposure in mice induces epithelial-mesenchymal transition in the large airways. *PLoS One*. 2011;6(1):e16175.

24. Heijink IH, Postma DS, Noordhoek JA, Broekema M, Kapus A. House dust mite-promoted epithelial-to-mesenchymal transition in human bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42(1):69-79.
25. Imperial college L. Airway inflammation and remodelling. .
26. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, et al. Interleukin-13: Central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998;282(5397):2258-2261.
27. Nicolaides NC, Holroyd KJ, Ewart SL, et al. Interleukin 9: A candidate gene for asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):13175-13180.
28. Hamid Q, Azzawi M, Ying S, et al. Interleukin-5 mRNA in mucosal bronchial biopsies from asthmatic subjects. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1991;94(1-4):169-170.
29. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):218-230.
30. Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Bucchieri F, Puddicombe S, Davies DE. Epithelial-mesenchymal communication in the pathogenesis of chronic asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(2):93-98.
31. Johnson PR. Role of human airway smooth muscle in altered extracellular matrix production in asthma. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28(3):233-236.
32. Lazaar AL, Panettieri RA, Jr. Is airway remodeling clinically relevant in asthma? *Am J Med*. 2003;115(8):652-659.
33. Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Labonte I, et al. CCR3 expression and function in asthmatic airway smooth muscle cells. *J Immunol*. 2005;175(4):2702-2708.
34. Chakir J, Laviolette M, Boutet M, Laliberte R, Dube J, Boulet LP. Lower airways remodeling in nonasthmatic subjects with allergic rhinitis. *Lab Invest*. 1996;75(5):735-744.
35. Boulet LP, Turcotte H, Laviolette M, et al. Airway hyperresponsiveness, inflammation, and subepithelial collagen deposition in recently diagnosed versus long-standing mild asthma. influence of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(4 Pt 1):1308-1313.
36. Payne DN, Rogers AV, Adelroth E, et al. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(1):78-82.
37. Elshaw SR, Henderson N, Knox AJ, Watson SA, Buttle DJ, Johnson SR. Matrix metalloproteinase expression and activity in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2004;142(8):1318-1324.
38. McDonald DM. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(10 Pt 2):S39-45.
39. Nawijn MC, Hackett TL, Postma DS, van Oosterhout AJ, Heijink IH. E-cadherin: Gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization. *Trends Immunol*. 2011;32(6):248-255.
40. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1438-1449.
41. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: At the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 2008;14(6):818-829.
42. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009;19(2):156-172.
43. Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 2005;24(37):5764-5774.
44. Doerner AM, Zuraw BL. TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. *Respiratory Research*. 2009;10:100.
45. Hackett TL, Warner SM, Stefanowicz D, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(2):122-133.
46. Zhou BP, Deng J, Xia W, et al. Dual regulation of snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2004;6(10):931-940.

47. Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, et al. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17(3):326-333.
48. Nakao A, Sagara H, Setoguchi Y, et al. Expression of Smad7 in bronchial epithelial cells is inversely correlated to basement membrane thickness and airway hyperresponsiveness in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110(6):873-878.
49. Kam Y, Quaranta V. Cadherin-bound beta-catenin feeds into the wnt pathway upon adherens junctions dissociation: Evidence for an intersection between beta-catenin pools. *PLoS One.* 2009;4(2):e4580.
50. Caraci F, Gili E, Calafiore M, et al. TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacol Res.* 2008;57(4):274-282.
51. Mucenski ML, Nation JM, Thitoff AR, et al. Beta-catenin regulates differentiation of respiratory epithelial cells in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289(6):L971-9.
52. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, zeb and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007;7(6):415-428.
53. Grunert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(8):657-665.
54. Nature Publishing Group 2. .
55. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007;13(8):952-961.
56. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med.* 2003;9(7):964-968.
57. Ekblom P. Genetics of kidney development. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1996;5(3):282-287.
58. Molloy EL, Adams A, Moore JB, et al. BMP4 induces an epithelial-mesenchymal transition-like response in adult airway epithelial cells. *Growth Factors.* 2008;26(1):12-22.
59. Hackett TL, Shaheen F, Johnson A, et al. Characterization of side population cells from human airway epithelium. *Stem Cells.* 2008;26(10):2576-2585.
60. Heijink IH, Postma DS, Noordhoek JA, Broekema M, Kapus A. House dust mite-promoted epithelial-to-mesenchymal transition in human bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(1):69-79.