

Het effect van roken op TGF- β signalering met betrekking tot de extracellulaire matrix
Gevolgen voor longontwikkeling en COPD



Auteur: A.E. Marneth
Datum: 9 juli 2009
Basiseenheid: Pathologie
Eerste begeleider: M.N. Hylkema
Tweede begeleider: P. de Vos



Samenvatting

Al jaren worden zwangere vrouwen aangeraden niet te roken, omdat componenten uit sigarettenrook ook het kind kunnen bereiken en de ontwikkeling van het kind zouden kunnen beïnvloeden. Er is aangetoond dat verhoogde Transforming Growth Factor- β (TGF- β) productie en concentraties, onder andere in de longen, gepaard gaan met blootstelling aan sigarettenrook. Blootstelling aan sigarettenrook wordt in het embryo geassocieerd met verminderde alveolarisatie en verminderd parenchymaal elastisch weefsel. Dit zijn effecten die juist niet bij TGF- β verhoging verwacht zouden worden, omdat TGF- β extracellulaire matrix (ECM) dikte positief beïnvloedt. Verminderde of verstoorde alveolarisatie is wellicht een risicofactor voor het ontwikkelen van longziekten waarin ECM remodelering plaatsvindt. Ook lipofibroblast-myofibroblast transdifferentiatie, mogelijk een gevolg van sigarettenrook, kan wellicht voor verminderde ontwikkeling van de alveoli zorgen. Naast het effect van TGF- β op de ECM, is TGF- β een groeifactor en stimuleert het inflammatie en oxidatieve stress. Een belangrijk embryonaal proces betrokken bij inflammatie is chromatine remodelering van pro-inflammatoire genen, wat langetermijn gevolgen kan hebben. In dit literatuuronderzoek worden de gevolgen van blootstelling aan sigarettenrook op TGF- β signalering in longontwikkeling weergegeven. Ook wordt aandacht besteed aan chronic obstructive lung disease (COPD), een longziekte die mogelijk deels door processen in gang gezet tijdens embryogenese, veroorzaakt kan worden.



Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	1
Inleiding	2
Hoofdstuk 1. Embryogenese	3
Hoofdstuk 2. Longontwikkeling	4
<u>2.1 Embryonale fase (3-7 weken)</u>	4
<u>2.2 Pseudoglandulaire fase (7-16 weken)</u>	4
<u>2.3 Canaliculaire fase (16-24 weken)</u>	4
<u>2.4 Sacculaire / Terminale sac fase (24-36 weken)</u>	5
<u>2.5 Alveolaire fase (36 weken – volwassene)</u>	5
<u>2.6 Alveolarisatie</u>	6
Hoofdstuk 3. TGF-β superfamily	7
Hoofdstuk 4. De rol van TGF-β in normale longontwikkeling	8
Hoofdstuk 5. TGF-β signalering en de ECM	9
<u>5.1 Protease / Anti-protease balans</u>	9
<u>5.2 Fibrose</u>	10
<u>5.3 (Tropo)elastine</u>	11
<u>5.4 Advanced glycation end products (AGEs)</u>	12
<u>5.5 Histone (de)acetylering onder invloed van sigarettenrook</u>	12
Hoofdstuk 6. Nicotine en TGF-β	13
<u>6.1 LIF-MYF transdifferentiatie</u>	14
Hoofdstuk 7. COPD: een ziekte met emfyseem en verhoogde TGF-β expressie	15
<u>7.1 Ontwikkeling van de longen</u>	16
<u>7.2 Genetische predispositie</u>	16
Conclusie / discussie	18
Referenties	20



Inleiding

Een zwangere vrouw bepaalt door haar dieet en levensstijl grotendeels waar haar kind aan blootgesteld wordt. Zo is het mogelijk dat een zwangere vrouw rookt en daarmee schadelijke componenten en daaruit ontstane metabolieten uit sigarettenrook overbrengt naar de foetus (1). Nicotine is bijvoorbeeld een component in sigarettenrook. Een metaboliet van nicotine, cotinine, is aanwezig in het serum van foetussen van een rokende moeder. Cotinineconcentraties liggen tussen de 21 en 36 weken zwangerschap op ongeveer 90% van de maternale niveaus, onafhankelijk van leeftijd of aantal gerookte sigaretten (1). Naast actief roken, leidt ook passief roken tot een significante verhoging van cotinineconcentraties in de foetus (1). Het is voor de hand liggend aan te nemen dat ook andere componenten uit sigarettenrook of metabolieten daarvan in contact komen met de foetus.

Alle componenten en metabolieten die in contact komen met de foetus kunnen in principe vervolgens de ontwikkeling van de foetus beïnvloeden. Uit onderzoek naar de invloed van prenatale blootstelling aan rook, is gebleken dat deze blootstelling een negatieve invloed heeft op longontwikkeling. Zo leidt prenatale blootstelling aan rook tot een verlaagde longfunctie, luchtwegobstructie, luchtweg overgevoeligheid en verminderde longvolgroeïing (2-5). Naast in mensen, is ook in dieren aangetoond dat longontwikkeling wordt aangetast na blootstelling aan rook. In ratten bleken foetussen waarvan de moeder (actief of passief) aan rook blootgesteld was, een lager longvolume en een lager aantal vergrote alveoli te bevatten dan foetussen waarvan de moeder niet aan rook was blootgesteld (6). Verder bleken ratten minder parenchymaal elastisch weefsel (6), een hogere intersitiumdichtheid, minder elastine en collageen te bevatten (7) en werd een hogere expressie van *Clara cell secretory protein* waargenomen (8).

Deze resultaten ondersteunen de hypothese dat componenten uit sigarettenrook of metabolieten hiervan via de moeder het embryo bereiken en invloed hebben op embryonale ontwikkeling. In dit literatuuronderzoek wordt gekeken naar het effect van prenatale blootstelling aan sigarettenrook op de ontwikkeling van de longen. Hierbij wordt specifiek gekeken naar het effect op de *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) signaleringsweg, welke onder andere een belangrijke rol speelt in het vertakkingproces van de luchtwegen en de vorming van alveoli. Bij de vorming van alveoli speelt correcte vorming van de extracellulaire matrix (ECM), waar TGF- β bij betrokken is, een belangrijke rol. Deze ECM wordt vernietigd bij longemfyseem, vaak gezien als onderdeel van de ziekte *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD), maar juist buiten proportie aangemaakt bij fibrose. Mogelijk heeft prenatale blootstelling aan sigarettenrook dusdanige effecten op longontwikkeling dat dit op latere leeftijd ziektes als COPD kan veroorzaken.

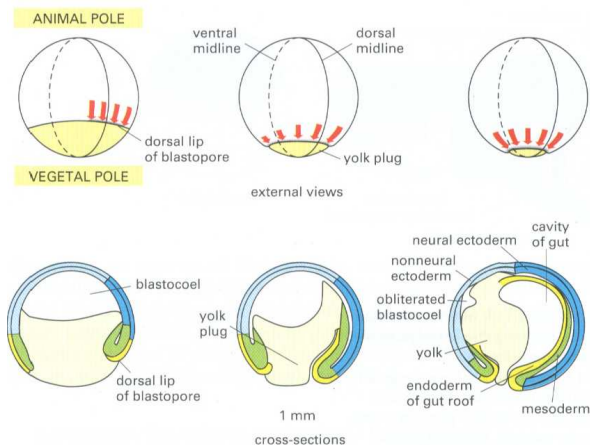
Hoewel TGF- β in epitheelcellen van de long hoger tot expressie wordt gebracht door blootstelling aan sigarettenrook (9-10) en TGF- β alveolarisatie en ECM productie aanwakkert, wordt blootstelling aan sigarettenrook geassocieerd met minder alveolarisatie en minder parenchymaal elastisch weefsel. Dit, en ook de invloed van (prenatale) blootstelling aan sigarettenrook op het ziekteproces van COPD, wordt geprobeerd te verklaren.

Samenvattend wordt het effect van prenatale blootstelling aan sigarettenrook op de TGF- β signalering in met name alveolarisatie bestudeerd. Dit wordt vervolgens gekoppeld aan de ontwikkeling van COPD.



Hoofdstuk 1. Embryogenese

Een bevruchte eicel is het begin van een nieuw organisme. Deze eicel ontwikkelt zich uiteindelijk tot een volledig organisme met al zijn verschillende celtypes en bijbehorende functies. Ook vormt het de extra-embryonale *amniotic sac* en de placenta. In eerste instantie deelt de eicel zich tot zestien cellen op dag drie na bevruchting (11). Tussen de cellen worden de bindingsstructuren *tight junctions* gevormd, wat leidt tot een compacte bol met cellen, de morula. Vervolgens wordt een interne holte gevormd, waarna de structuur een blastocyst genoemd wordt. De buitenste cellaag van deze bol, het trofocytoderm, zal zich ontwikkelen tot de extra-embryonale weefsels. Het binnenste klontje vormt het eigenlijke embryo. Na ongeveer vier dagen maakt het trofocytoderm contact met de baarmoederwand, waar het de vorming van de placenta in gang zet. Het binnenste klontje cellen groeit en differentieert in de tussentijd. Een deel van dit klontje cellen vormt de overige extraembryonale structuren waaronder de dooierzak, terwijl de rest van de cellen zich ontwikkelt tot embryo. Deze embryonale cellen transformeren door middel van gastrulatie van een holle bol tot een structuur met een *gut*. Hierbij vormt de buitenste cellaag de epitheliale laag. Het grootste gedeelte van deze cellaag blijft extern en vormt het ectoderm (figuur 1). Dit ectoderm is de voorouder van de epidermis (figuur 1, in lichtblauw) en het zenuwstelsel (figuur 1, in donkerblauw). Een deel van de embryonale cellen plooit naar binnen en vormt het endoderm (figuur 1, in geel), de voorouder van de maag en zijn aanhangsels, zoals long en lever. Een andere groep cellen beweegt naar de ruimte tussen het ectoderm en het endoderm en vormt het mesoderm (figuur 1, in groen). Het mesoderm ontwikkelt zich tot spieren, bindweefsels en verschillende andere componenten.



Figuur 1: Drie stappen in gastrulatie

In de bovenste drie plaatjes geven het embryo aan, gezien vanaf de buitenkant. De rode pijltjes tonen de beweging van de cellen tijdens gastrulatie. De onderste drie plaatjes zijn doorsnedes in het middelste vlak van het embryo (het vlak van de dorsale en ventrale middellijn). (12)

Na gastrulatie bepalen *Egg-polarity*, *gap* en *pair-rule*, gevolgd door *segment-polarity* genen de lichaamsassen en de vorming van segmenten (11). Al deze genen sturen *homeotic selector* genen aan, welke de verschillen tussen de segmenten permanent vastleggen. Segment-polarity genen behouden en verfijnen daarnaast de expressie van andere segment-polarity genen. Dit zorgt ervoor dat cellen een geheugen krijgen wat betreft hun ligging en structuur binnen het segment. Ondertussen wordt er een cel-cel signaleringsgradiënt opgezet langs de dorsoventrale as, met het TGF- β familielid *Decapentaplegic* en zijn antagonist *Short gastrulation*. Deze gradiënten helpen met het verfijnen van de toekenning van verschillende celkarakteristieken.



Hoofdstuk 2. Longontwikkeling

In dit hoofdstuk wordt specifiek ingegaan op de longontwikkeling, zowel tijdens embryogenese als daarna. Longontwikkeling vindt in de mens namelijk plaats vanaf week drie in het embryo tot de leeftijd van zeven jaar. Hierin zijn verschillende fases te onderscheiden (figuur 3).

2.1 Embryonale fase (3-7 weken)

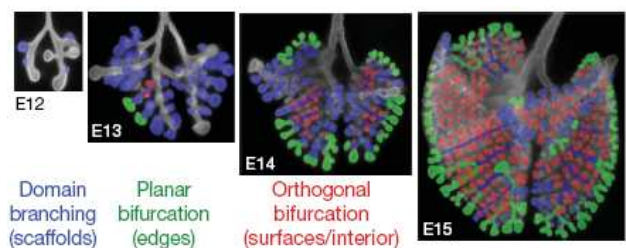
Na vier tot zes weken zwangerschap start de ontwikkeling van de longen in mensen (13). In de embryonale fase vindt de eerste ontkieming en aftakking van de longknopjes plaats vanuit de laryngotracheale groeve, gelegen in de voordam. Het proximale gedeelte van deze primitieve structuur groeit uit tot het strottenhoofd en luchtpijp, welke van de slokdarm wordt gescheiden. Vooroudercellen aan het distale gedeelte van de primitieve luchtpijp groeien uit tot de basis van de linker en rechter hoofdbronchi van de long (13). Epitheelcellen vallen mesenchym (embryonaal bindweefsel) binnen om gezamenlijk de long te vormen. Dit epitheel ontkiemt en vormt met het naastliggende mesenchym het begin van een buizensysteem dat herhaaldelijk zal vertakken tijdens de ontwikkeling. De proliferatie of groei van epitheel- en mesenchymcellen worden door de TGF- β signaleringsweg, die centraal staat in dit literatuuronderzoek, beïnvloed. TGF- β remt celproliferatie van veel verschillende celtypes, waaronder van epitheelcellen. Daarentegen worden de meeste mesenchymcellen echter gestimuleerd in groei door TGF- β (14). De embryonale fase eindigt met de ontwikkeling van de toekomstige broncho-pulmonaire segmenten (15).

2.2 Pseudoglandulaire fase (7-16 weken)

Na vorming van de broncho-pulmonaire segmenten zorgt verdere vertakking van de linker en rechter bronchi (tot 21 generaties) voor ontwikkeling tot de terminale bronchiolen in de pseudoglandulaire fase (13, 15). De toekomstige luchtwegen bevatten op dit punt kleine luimen en schubachtig epitheel. Ze zijn ingebed in snelgroeiend mesenchym en de structuur heeft een klierachtige morfologie.

2.3 Canaliculaire fase (16-24 weken)

Het begin van deze fase wordt gekarakteriseerd door extensieve angiogenese in het snelgroeiende mesenchym om een dichtbepakt capillair netwerk te vormen (15). De diameter van de luchtwegen neemt toe met als gevolg een afname in epitheeldikte en de uiteinden van de bronchiolen vertakken zich verder (figuur 2). Daarnaast vindt differentiatie van het mesenchym plaats, wat resulteert in vorming van andere essentiële cellen zoals chondrocyten, fibroblasten en myoblasten.



Figuur 2: Vertakking van de longen in muizen
Schaal: lengte zwarte lijn 100 μ m. (28)



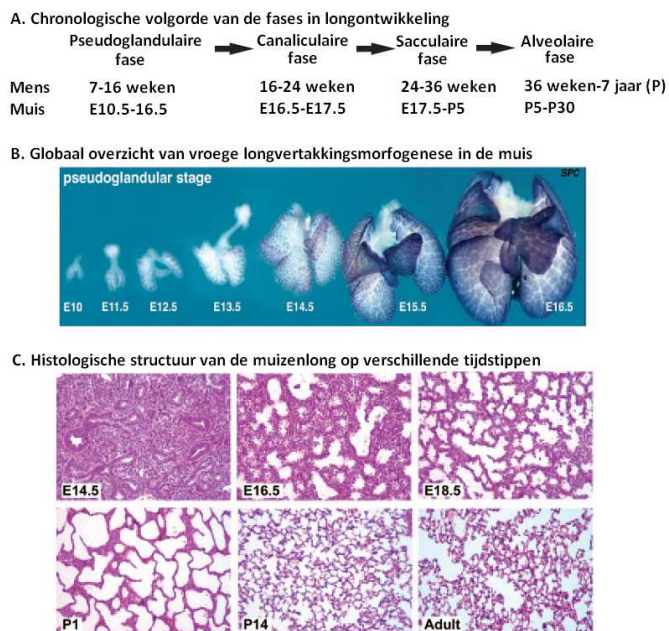
2.4 Sacculaire / Terminale sac fase (24-36 weken)

Wanneer het vertakkingproces is voltooid, kan worden begonnen aan de vorming van alveoli (10). Er vindt in dit proces, wat plaats heeft in de sacculaire fase, vertakking en groei van de *terminal sacs* of primitieve alveolaire buisjes plaats (15). Voortschrijdende verdunning van het stroma brengt de capillaren in contact met de toekomstige alveoli. Daarnaast ontstaan er functionele type II pneumocyten die een essentiële rol spelen in toekomstige alveoli. Type I pneumocyten differentiëren en vormen cellen met een type II-achtig fenotype. Deze cellen vlakken af, waardoor het epitheeloppervlakte vergroot wordt en onvolwassen alveoli ontstaan (13). Na 25 weken heeft zich vanuit deze onvolwassen alveoli een rudimentair, maar functionele, bloed/gas barrière gevormd. Ontwikkeling van de alveoli continueert door verdere vergroting van de *terminal sacs*, depositie van elastine met daaromheen ontwikkeling van gevasculariseerde septae.

2.5 Alveolaire fase (36 weken – volwassene)

De rudimentaire bloed/gas barrière volgroeit in de alveolaire fase van de long, begint op week 36. De vorming van nieuwe alveoli gaat door tot de leeftijd van twee of drie jaar (15). Verder vindt er optimalisatie van microvascularisatie plaats vanaf de geboorte tot een leeftijd van twee à drie jaar. Alveolarisatie vindt bij de mens plaats tot minstens zeven jaar, waardoor de alveolaire gasdiffusieoppervlakte 20x groter wordt.

Het gehele ontwikkelingsproces van de long (figuur 3) wordt bepaald door een wisselwerking van netwerken en transcriptiefactoren, matrix componenten en fysieke krachten (13, 16-19). Sigarettenrook en incorrecte hoeveelheden groeifactoren zoals TGF- β hebben zoals genoemd een nadelig effect op de ontwikkeling van de longen (9-10).



Figuur 3: Longontwikkeling chronologie

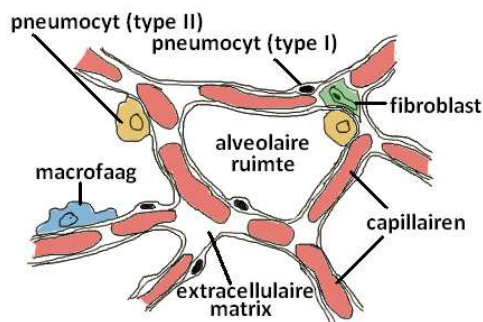
- A. De verschillende fases met tijdsaanduiding in mensen en in muizen (embryonaal, E, in dagen en postnataal, P, in weken).
- B. Vertakkingsmorfogenese van een muizenlong waarin expressie van Sp-C getoond wordt.
- C. Histologische structuren van een muizenlong op verschillende tijdstippen. Het weefsel is met een hematoxylineosine kleuring zichtbaar gemaakt. (13)



2.6 Alveolarisatie

Omdat TGF- β betrokken is bij alveolarisatie en dit onderwerp nog veel aan bod zal komen in dit schrift, wordt hier extra aandacht aan besteed. Vorming van alveoli (figuur 4) vindt plaats tijdens de ontwikkeling van de distale long: zoals genoemd, in de canaliculaire, sacculaire en alveolaire fases (20). Tijdens de canaliculaire fase verlengen de uiteindes van epitheliale knopjes zich en vertakken ze zich om kleine clusters van buisjes en knopjes te vormen. Deze ontwikkelen zich verder tijdens de sacculaire fase door middel van primaire septatie. Dit zorgt voor de vorming van primitieve *sacculen*, wat dikke, gladde wanden zijn die twee lagen met capillairen bevatten (21). Deze capillairen zijn aan beide kanten met epitheel belijnd.

Tijdens de laatste maand van de zwangerschap in mensen tot ongeveer vijf dagen na de bevalling, ontwikkelen de *sacculen* zich verder tot alveoli via secundaire septatie en remodelering van de sacculaire wand. De sacculen worden gedeeld in pre-alveolaire ondiepe zakjes door secundaire septa (21). De secundaire septa worden vervolgens geherstructureerd tot dunne wanden die een enkel capillair netwerk bevatten. Dit wordt vermoedelijk gedaan door de wanden van de primitieve *sacculen* aan sterke vezelbundels te koppelen en richting de luchtruimte te trekken, waarbij er twee wanden ontstaan met elk een enkel capillair netwerk (aangetoond bij ratten 21). Onder andere voor dit proces moeten de vezelbundels van de ECM goed georganiseerd zijn. De structuur van het longparenchym wordt verzekerd door deze vezelcontinuïteit; wanneer een vezel geknipt wordt, zorgt dit voor het instorten van het septum, waarna de aangrenzende delen geherstructureerd worden, zoals bij emfyseem (21). Een aantal jaren na de geboorte in de mens of een aantal weken na de geboorte in de muis, neemt de vorming van secundaire septa af. Alveolvorming kan echter nog continueren via een ander mechanisme (22).



Figuur 4: Alveolus

Algemeen overzicht van de alveolus met een type I en een type II pneumocyt, fibroblast, macrofaag, capillairen en ECM. (23)

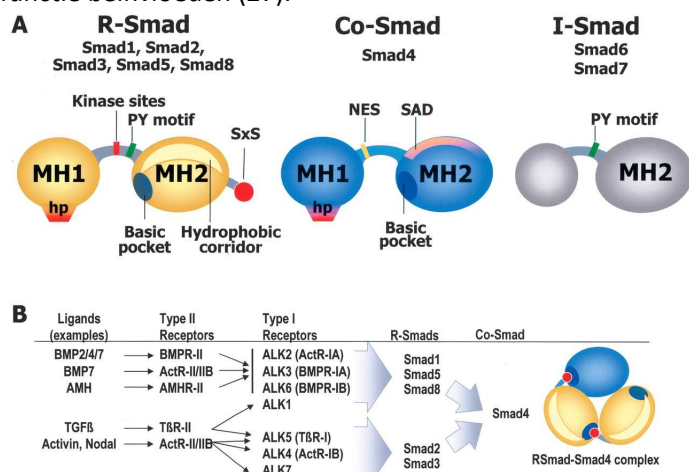
Met behulp van gerichte gen inactivatie studies bij muizen heeft men genen geïdentificeerd die sacculevorming of secundaire septavorming beïnvloeden. TGF- β blijkt zowel belangrijk in sacculevorming als in vorming van alveoli belangrijk. De vorming van alveoli is verantwoordelijk voor de gigantische toename van de respiratoire gasuitwisselingsoppervlakte van de longen. Er ontstaat uiteindelijk een gasdiffusie-oppervlakte van 70 m² met een dikte van 1 μ m. In een volwassene kan hiermee tussen de vijf en vijfentwintig liter bloed per minuut van gaswisseling kan worden voorzien.



Hoofdstuk 3. TGF- β superfamily

Al een aantal malen is vermeld dat TGF- β een belangrijke factor in longontwikkeling is en dat TGF- β geïnduceerd wordt door sigarettenrook (9-10). Vandaar dat een introductie in de TGF- β familie niet mag ontbreken. De TGF- β superfamilie bevat structureel op elkaar lijkende cytokines die in vele diersoorten voorkomen: van wormen en insecten tot zoogdieren. Naast TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, behoren onder andere de activins, bone morphogenetic proteins (BMPs) en growth differentiation factors (GDFs) ook tot de TGF- β familie. TGF- β familieleden zijn betrokken bij allerlei cel-cel signaleringswegen met betrekking tot proliferatie, apoptose, differentiatie en migratie en spelen een essentiële rol in de ontwikkeling van multicellulaire organismen en in weefselhomeostase (24). Zo is er ook een rol voor hen weggelegd in longvertakking en alveolarisatie en spelen ze een belangrijke rol in de vorming en het behoud van de ECM.

TGF- β wordt gesynthetiseerd als membraangebonden precursor die geknipt wordt door MMP-2 om de functionele ligand vrij te laten (25). TGF- β bindt vervolgens aan serine/threonine kinase receptoren. Activatie van de TGF- β receptor type II leidt tot het samenkomen van type II en I, waarbij het type II receptor gefosforyleerd wordt en type I geactiveerd wordt (figuur 5) (26). Deze type I receptor fosforyleert vervolgens specifieke receptorgeactiveerde Smads (R-Smads). Wanneer de R-Smad gefosforyleerd is, vormt het een heteromerisch complex met de gemeenschappelijke partner Smad4. De heteromerische complexen verplaatsen dan naar de nucleus, waar ze specifieke genen activeren door coöperatieve interacties met andere DNA-bindende eiwitten en co-activatoren of co-repressoren. Naast deze Smads die een rol spelen bij signaaltransductie, kunnen Smads ook de activering van receptorgereguleerde Smads remmen. Voorbeelden van deze Smads zijn de I-Smads Smad6 en Smad7. Er bestaan ook niet-Smad gereguleerde TGF- β signaleringswegen, maar ook signaleringswegen die Smad functie beïnvloeden (27).



Figuur 5: Smad eiwitten en hun signaleringsroutes

A. Smad eiwitten bevatten twee geconserveerde globulaire domeinen: MH1 en MH2 en een variabele koppeling regio. De zeven Smad eiwitten die zoogdieren bevatten zijn weergegeven. Het koppeling gedeelte bevat fosforyleringsplaatsen voor MAPKs, CDKs en andere eiwit kinases. De moleculen bevatten verder structurelementen waardoor ze interacties aan kunnen gaan met bijvoorbeeld *Smurf ubiquitin* ligases en geactiveerde type I receptoren. B. Hierin zijn TGF- β familieleden weergegeven en de receptoren waarop ze aangrijpen en de R-Smads die vervolgens gefosforyleerd worden. De R-Smads vormen een complex met Smad 4, waarbij zowel heterotrimeren als heterodimeren complexen gevormd kunnen worden. (26)



Hoofdstuk 4. De rol van TGF- β in normale longontwikkeling

Alle drie in het vorige hoofdstuk benoemde vormen van TGF- β blijken behoorlijk hoog tot expressie te komen tijdens normale longmorfogenese in de muis. Het blijkt dan ook essentieel voor normale longontwikkeling en -functie. Muizen waarin het TGF- β gen gericht was verstoord, overleden namelijk rond de geboorte als gevolg van het onvermogen om te ademen. De longen zagen er echter structureel niet abnormaal uit (28). In de ontwikkeling van de longen komt TGF- β 1 als eerste tot expressie, namelijk op dag elf van de zwangerschap bij muizen. Het komt tot expressie in het cytoplasma van de stromale en de epitheliale cellen van de primordiale buizen. TGF- β 1 blijkt een cruciale rol te spelen in vertakking van de longen en toont een hogere expressie tussen dag veertien en vijftien in de embryogenese van de muis. Dit staat in verband met differentiatie van de primordiale buizen tot alveolaire en bronchiolaire buizen (29). TGF- β 1 blijkt voor te komen op dezelfde plaatsen als verschillende ECM eiwitten, waaronder collageen types I en III, die tot expressie komen in het epitheliale-mesenchymale grensvlak (29). Naast TGF- β 1, komt ook TGF- β 2 in de longen voor. TGF- β 2 transcripten zijn echter alleen aangetroffen in het endodermale bronchiolaire epitheel, waarin de expressie hoger wordt tijdens latere fases van ontwikkeling (30). Dan is er nog TGF- β 3, welke tot expressie komt van dag 12.5 tot 15.5 van de embryonale ontwikkeling van de muis. Het mesenchym van de trachea toont als eerste transcripten, gevolgd door expressie in epitheelcellen (30).

Exogene toevoeging van TGF- β 1 en TGF- β 2 remt concentratie-afhankelijk de het vertakkingproces in een gecultiveerde muis embryolong (31-32). Voor TGF- β 1 blijkt deze remming geassocieerd met de suppressie van het proto-oncogen N-myc die tot expressie komt in epitheelcellen. N-myc suppressie leidt tot G1 fase arrest in de epitheelcellen, waarvan de rol in het vertakkingproces in hoofdstuk 2 is beschreven (33). Vertakking van de long werd daarnaast gestimuleerd wanneer TGF- β 1R signalering uit werd geschakeld (32, 34). Ook door het voorkomen van TGF- β 1 geïnduceerde downregulatie van epitheliale differentiatiemarker genen zoals surfactant proteïne C werd vertakking gestimuleerd.

In vivo en in vitro studies met overexpressie van TGF- β 1 in muizen en cellen resulteerde in het verstoren van epitheliale differentiatie en remmen van de synthese van Clara cell secretory protein, fosfolipide en de surfactant eiwitten A, B en C (35-37). In dieren met een knock-out van dit gen ontwikkelde zich binnen twee tot drie weken na de geboorte een diffuus inflammatoir syndroom (38-39). Dit diffuse inflammatoire patroon werd gekenmerkt door inflammatie van het endotheel en interstitiële longontsteking. Dieren met TGF- β 2 en TGF- β 3 knock-outs zijn ook onderzocht. In tegenstelling tot TGF- β 2 null mutanten, hadden TGF- β 3 null mutant muizen een specifiek neonataal lethaal long fenotype, welke gekarakteriseerd werd door ontwikkelingsachterstand in alveolarisatie (40). Zo was er sprake van alveolaire hypoplasie, verminderde septumvorming en verminderde expressie van surfactant proteïne C (40). Al met al lijkt TGF- β een belangrijke rol te spelen in de ontwikkeling van de longen tijdens het vertakken en tijdens alveolarisatie. Vertakking wordt onderdrukt, terwijl alveolarisatie gestimuleerd wordt. Het effect wordt bewerkstelligd door differentiatie en proliferatie van cellen te beïnvloeden.



Hoofdstuk 5. TGF- β signalering en de ECM

Bij de vorming en ook remodelering (41) van alveoli, waarin TGF- β erg belangrijk is, speelt afzetting van ECM componenten zoals collageen en elastine een belangrijke rol. Er dient echter een balans te bestaan in de productie van ECM en de afbraak ervan. De afbraak van ECM wordt gereguleerd door een protease / anti-protease balans en plasminogeen activatiesysteem (PA systeem). Een disbalans in oxidatieve beschadiging en herstel of in proliferatie en apoptose van alveolaire cellen zijn mogelijke andere belangrijke factoren in de ECM balans (42-49). Null mutatie van TGF- β 1 resulteert in lethale longinflammatie, hoewel overmatige TGF- β 1 expressie resulteert in alveolaire hypoplasia in de pasgeborene (50) en tot fibrose in volwassenen (51). De meeste studies richten zich op TGF- β 1, omdat dit de meest belangrijke vorm lijkt bij vorming van fibrose. Echter, er zijn ook hogere concentraties van TGF- β 2 en TGF- β 3 gevonden bij fibrose (52). Cytokines die hun profibrotische effecten via TGF- β lijken te bewerkstelligen, zijn tumor necrosis factor- α (TNF- α) (51), keratinocyte growth factor (53), angiotensine II (54) en interleukine 10 (55).

5.1 Protease / Anti-protease balans

Matrix metalloproteases (MMPs) zijn zinkafhankelijke, redoxgevoelige proteases en kunnen ECM componenten degraderen: ze zijn betrokken bij de afbraak van deels gedegradeerde vezelachtige collagenen, basaalmembraancollagenen, proteoglycanen, elastine en fibronectine (56). Neutrofielen, macrofagen, mononucleaire inflammatoire cellen, dendritische cellen en type II pneumocyten scheiden grote hoeveelheden extreem actieve MMPs uit (57-62). Neutrofiel elastase is ook een belangrijke protease. Het degradeert elastine, collageen I, II en III, proteoglycanen en zijn remmer (anti-protease) TIMP-1 (63). Een ander molecuul waarvoor hierbij een rol is weggelegd, is macrofaag elastase. Macrofaag elastase (MMP-12) degradeert tevens zijn remmer (anti-protease), α 1-antitrypsin (63).

De protease / anti-protease balans wordt veelvuldig aangehaald bij beschrijving van ECM processen. Mogelijk bestaat er ook in de embryonale ontwikkeling een balans tussen productie en afbraak van ECM waarbij proteases en anti-proteases betrokken zijn. Voor de protease Desintegrin and metalloprotease domein proteïn-13 (ADAM-13) blijkt namelijk een belangrijke rol weggelegd in embryogenese van *Xenopus laevis* (64). Verder tonen TIMP-3, een anti-protease, null muizen een significante grotere luchtruimte in de longen vergeleken met wildtype muizen op het moment van alveolarisatie (postpartum dagen 1, 5, 9, en 14) (65). Alveolaire wanden van TIMP-3 null muizen was bovendien dunner dan van controlemuizen. Gevonden hogere MMP-2 activiteit in de afwezigheid van TIMP-3 zou wellicht ECM proteolyse kunnen aanwakken, waardoor juiste vorming van primitieve alveolaire septa tijdens de sacculaire fase van alveologenese verstoord wordt. TIMP-3 zou zo indirect alveolvorming kunnen reguleren in de muis (65).

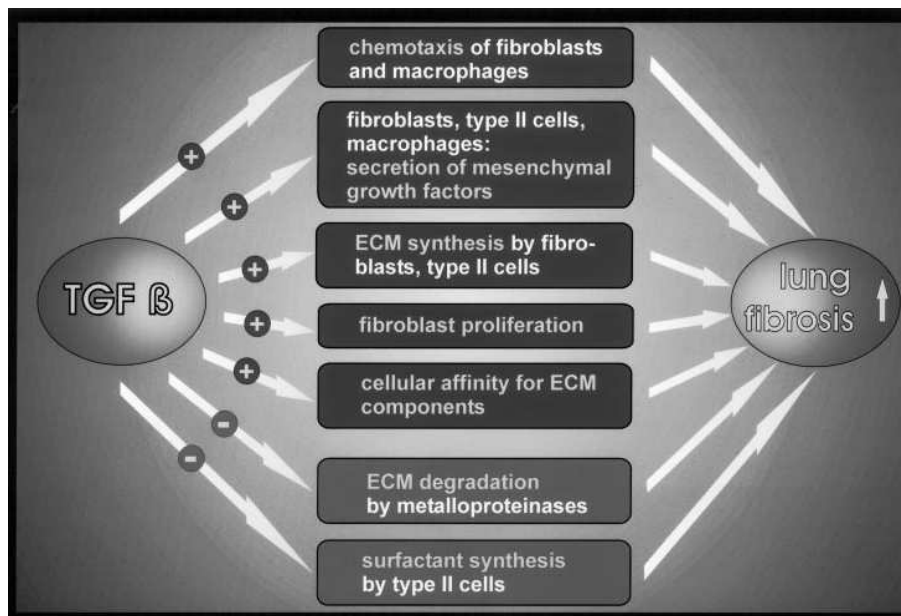


5.2 Fibrose

TGF- β 1 zou wellicht fibrose kunnen induceren onder andere via de proapoptotische moleculen Bax en Bid (66). Bid activatie en Bid-Bax interacties leveren daarnaast een belangrijke bijdrage aan de inflammatoire reacties die door TGF- β worden geïnduceerd. De fibrose zou het gevolg kunnen zijn van stimulatie van mRNA accumulatie door TGF- β . Dit is het geval voor collageen I, II en III, fibronectine, elastine, laminine en type IV collageen mRNA. Wat interpretatie van deze gegevens lastig maakt, is het feit dat TGF- β daarnaast de accumulatie van zowel mRNA van proteases (MMP-12) als van anti-proteases (TIMP-1, TIMP-3) stimuleert. Bovendien wordt MMP-9 activiteit geremd. Zowel Bax als Bid zijn proapoptotische factoren en apoptose van epitheelcellen blijkt essentieel in het kunnen ontwikkelen van TGF- β 1 geïnduceerde fibrose en alveolaire remodelering in ziekteprocessen (41).

TGF- β 2 zorgde in astrocyten voor een hogere expressie van elastine, collageen VI α 2, collageen VI α 3, MMP-2, TIMP-1/-3 en Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (67). Bovendien lagen tissue plasminogeen activatorconcentraties (tPA) een stuk lager. De invloed van TGF- β 2 op TIMP-1, -3, PAI-1 en tPA expressie verlaagt de activatie van MMPs. Dit alles draagt bij aan verdikking van de ECM.

Sigarettenrook verhoogt de expressie en vrijgifte van TGF- α , TGF- β , amphiregulin en diphtheria toxin receptor in epitheelcellen van de luchtweg (9). Daarnaast stimuleert sigarettenrook de productie van profibrotische groeifactoren in de wand van de luchtweg (figuur 6) (68). Fibroblasten zijn de cellen die voornamelijk betrokken zijn bij productie van ECM. Na enkele keren blootstelling aan rook, werd bij muizen na twee uur een verhoogde concentratie van procollageen, CTGF, TGF- β , platelet-derived growth factor (PDGF)-A en -B gevonden (69).

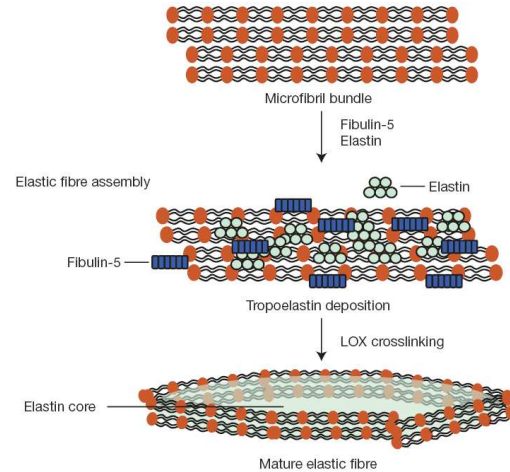


Figuur 6: De effecten van TGF- β op ECM, leidend tot fibrose (68)



5.3 (Tropo)elastine

Elastine is zoals genoemd een belangrijk onderdeel van de ECM. Men denkt dat uitgescheiden tropoelastinemoleculen aan fibrilline microvezels worden toegevoegd (70) (figuur 7). Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) bindt de N-terminus van fibrilline-1 moleculen aan elkaar, waarna tropoelastine of kleine elastine aggregaten in verbinding worden gebracht met de fibrilline microvezels. Fibulin-5 speelt mogelijk een rol in dit verbindingproces. Lysyl oxidase (LOX) en/of lysyl oxidase-like (LOXL) moleculen stabiliseren vervolgens de neergeslagen elastine.



Figuur 7: Elastine en microfibril assemblage (70)

TGF- β verhoogt de synthese van tropoelastine (figuur 8), mogelijk via de Smad2/3 weg en stabiliseert wellicht tropoelastine mRNA (71). Deze mRNA stabilisatie zou kunnen gaan via *proteïne kinase C- Δ* (PKC- Δ) en de door stress geïnduceerde *proteïne kinase p38* (71). Neutrofiel elastase blijkt een negatieve feedback loop te bewerkstelligen waardoor de hoeveelheid tropoelastine in balans blijft (figuur 8). Neutrofiel elastase initieert het vrijkomen van oplosbare epidermal growth factor receptor (EGFR) liganden (72). Deze grijpen aan op de EGFR en via het EGFR/Mek/Erk pad wordt de kortlevende Smad transcriptional corepressor TG interacting factor (TGIF) gefosforyleerd (72). Deze fosforylatie zorgt voor stabilisatie en daardoor is er meer TGIF om in competitie te gaan met coactivatoren (72). Bovendien blijft het na binding mogelijk langer geassocieerd met Smad2 en Smad3 door deze stabilisatie van TGIF en/of door het voorkomen van ubiquitatie van Smad2 (73). Het door TGF- β geïnitieerde pad voor transcriptie van tropoelastine wordt daarmee onderbroken.

TGF- β \uparrow \rightarrow Smad2/3 \uparrow \rightarrow tropoelastine \uparrow

TGF- β \uparrow \rightarrow PKC- Δ /p38 \uparrow \rightarrow tropoelastine mRNA stabilisatie \uparrow

NE \uparrow \rightarrow EGFR ligands \uparrow \rightarrow EGFR/Mek/Erk \uparrow \rightarrow TGIF fosforylatie \rightarrow TGIF en TGIF-Smad2/3 associatie \uparrow \rightarrow tropoelastine \downarrow

Figuur 8: Effect van TGF- β en NE op tropoelastine concentraties

Nullmutatie van Smad3 resulteert in de muis in eerste instantie in een subtiele afwijking van de organisatie van de matrix, wat gevolgd wordt door vroege ontwikkeling, maar milde vorm, van pulmonair emfyseem (74). Deze vroege ontwikkeling van emfyseem in Smad3 null mutanten wordt ook geassocieerd met overmatige MMP activiteit. Passief roken verergert en versnelt alveolaire vernietiging in jonge Smad3 null muizen (13). Wanneer de ECM niet aanwezig is, gedegrademd, niet correct gecrosslinked of niet goed georiënteerd, kan dit leiden tot verminderde alveolarisatie. Een afwijkende of gedegradeerde matrix van alveolaire crests is vervolgens niet in staat de structurele nis, maar ook niet



de omgevingsignalen, te bieden aan alveolaire stam-/voorlopercellen om het correcte fenotype aan te nemen en/of een herstelproces in te zetten.

5.4 Advanced glycation end products (AGEs)

AGEs worden geproduceerd door niet-enzymatische glycosylering of oxidering van eiwitten en vetten, gedreven door blootstelling aan rook of inflammatoire stress (75). AGEs accumuleren in mensen die roken en blijken giftig voor embryo's (76). Er is aangetoond dat accumulatie van AGEs kan leiden tot hogere TGF- β 1 expressie, connective tissue growth factor (CTGF), fibronectine mRNA expressie, radicaalvorming en lagere glutathionconcentraties in sommige cellijnen (77). Het leidt (indirect) ook tot een hogere productie van ECM componenten (78), bijvoorbeeld via TGF- β en CTGF, een molecuul dat verderop in het TGF- β signaleringspad een rol speelt. Radicaalvorming en lagere glutathionconcentraties verhogen ook weer de oxidatieve stress. Bovendien zorgt ligandbinding aan de AGE receptor (RAGE) voor activering van mechanismes die geassocieerd worden met afweer, weefselremodelering en inflammatie (79). RAGEs blijken in de normale long in lage concentratie aanwezig op bronchiaal epitheel, type II pneumocyten, macrofagen en sommige endotheelcellen (75). In pathologische omstandigheden als longontsteking blijken daarnaast ook fibroblasten RAGE tot expressie te brengen (75). Bovendien produceren fibroblasten in longontsteking ook AGEs. De activatie van RAGE is wellicht relevant als een niet-specifiek pad voor langdurige inflammatie in meerdere longziektes.

5.5 Histone (de)acetylering onder invloed van sigarettenrook

In een postnatale studie bij ratten is aangetoond dat blootstelling aan sigarettenrook daarnaast leidt tot veranderende chromatine remodelering met verminderde histone deacetylase activiteit (80). Dit resulteert in verhoging van de transcriptie van proinflammatoire genen in longen van de ratten. Acetylering en deacetyleringsprocessen kunnen langdurige effecten hebben op de transcriptie van genen, waarbij acetylering het DNA ontvouwt en dus beschikbaar maakt voor transcriptie en deacetylering het tegenovergestelde effect heeft. Dit stond in verband met een hogere concentratie gefosforyleerde p38 MAPK in de long overeenkomstig met een verhoogde histone 3 fosfoacetylering, histone 4 acetylering, verhoogde DNA binding van Nuclear Factor-kappaB (NF-KB) en activator proteïne 1 (AP-1) (81) en ECM eiwitsynthese (52, 82-87). Er is ook aangetoond dat oxidatieve stress histone acetylering verhoogt en histone deacetylase activiteit verlaagt, leidend tot bemiddeling in NF-KB activatie (88). Foetussen van zwangere schapen waarbij chorioamnionitis werd geïnduceerd door LPS injecties, vertoonden geactiveerd NF-KB in neutrofielen en monocytten na twee of zeven dagen blootstelling aan LPS (89). Deze neutrofielen en monocytten brachten bovendien onder andere de activatiefactor macrophage-1 antigen (CD11b) tot expressie (89). Expressie van deze of andere membraaneiwitten zijn mogelijk ook betrokken bij COPD (hoofdstuk 7).



Hoofdstuk 6. Nicotine en TGF- β

Nicotine lijkt een belangrijke stof uit sigarettenrook die verantwoordelijk is voor de effecten op longontwikkeling van de foetus. Nicotine kan de placenta overbruggen en kan op nicotinerceptoren aangrijpen, die op vele foetale cellen aanwezig zijn. Prenatale blootstelling aan nicotine in apen leidt tot een verhoogde intensiteit van immunoreactiviteit van de acetylcholine $\alpha 7$ receptor in kraakbeenbevattende luchtwegcellen, bloedvaatwanden en luchtwegepitheelcellen, maar geen verandering in een van de andere types nicotinerceptoren (90). Verder leidt nicotinebehandeling tot meer kleuring van collageen rond de grote luchtwegen en vaten. Dit is in overeenstemming met de vinding dat blootstelling van een zwangere aap aan nicotine wordt geassocieerd met hogere type I en III collageen mRNA's en eiwitexpressie in luchtweg en alveolaire wanden en een verhoogde oppervlakte van de luchtwegwand (90). Het effect van blootstelling aan nicotine is wellicht het grootst tijdens de pseudoglandulaire fase, aangezien een hogere expressie van acetylcholine $\alpha 7$ receptoren gevonden is in deze fase bij muizen dan bij longen in latere fases (91). In deze fase vindt vooral ontwikkeling tot terminale bronchiolen plaats. Effect op longvertakking door nicotine is daarnaast ook gevonden: nicotine stimuleerde via de $\alpha 7$ receptor longvertakking in uitgenomen weefsel van muizen (91).

Blootstelling aan nicotine en een hogere TGF- β concentratie worden vaak samen gezien. Blootstelling aan nicotine kan via structurele remodelering leiden tot boezemfibrilleren. Boezem fibroblasten uit gezonde honden werden met nicotine behandeld voor dertig dagen (92). Dit zorgde voor significante upregulatie van de expressie van TGF- $\beta 1$ en TGF- βRII op eiwitniveau en een 60-70% afname in de miRNA concentraties van miR-133 en miR-590. De downregulatie van deze miRNAs zorgt voor de upregulatie van TGF- $\beta 1$ en TGF- βRII . De effecten van nicotine werden voorkomen door een $\alpha 7$ nicotine acetylcholine receptor antagonist. Al met al suggereert dit dat nicotine via de $\alpha 7$ acetylcholine receptor miR-113 en miR-590 kan downreguleren. Dit heeft hogere TGF- $\beta 1$ en TGF- βRII expressies tot gevolg. Mogelijk vindt een vergelijkbaar proces plaats in bronchiale fibroblasten en andere celtypes in de long, aangezien ook zij de $\alpha 7$ acetylcholine receptor bevatten (tabel 1).

Tabel 1: Verdeling van nicotinerceptoren subtypes in de long

	Subtype	Referentie
Bronchiale epitheelcellen	$\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \beta 2, \beta 4$	(109, 110, 111)
Alveolaire epitheliale cellen	$\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7$	(110)
Neuroendocriene cellen	$\alpha 7$	(109)
Submucosale klieren	$\alpha 7$	(110)
Luchtweg en bloedvat glad spierweefsel cellen	$\alpha 7$	(109)
Fibroblasten	$\alpha 7$	(109)
Pulmonaire macrofagen	$\alpha 7$	(109)



6.1 LIF-MYF transdifferentiatie

Long endoderm scheidt tijdens embryogenese parathyroid hormone-related protein (PTHrP) uit, waardoor lipofibroblast differentiatie wordt gestimuleerd in het mesoderm (93). Nicotine uit sigarettenrook verstoort de PTHrP-gedreven alveolaire epitheel-mesenchymale paracriene signaleringsweg, resulterend in transdifferentiatie van pulmonaire lipofibroblasten (LIFs) naar myofibroblasten (MYFs). De myofibroblasten worden in vele ziektes waarbij fibrose voorkomt, geassocieerd met het produceren van ECM eiwitten (93). De PTHrP gedreven Wnt downregulatie en cAMP afhankelijke proteïne kinase A (PKA) weg upregulatie, induceert normaalgesproken het alveolaire fibroblast lipogene fenotype (LIF) (93). Dit fenotype is essentieel voor verdere normale longontwikkeling en homeostase (94-95).

Onderzoek wijst uit dat PPAR γ mogelijk een antiproliferatief effect heeft en ECM productie vermindert (95). Wanneer door nicotine dit pad wordt onderbroken, zou dit kunnen leiden tot verhoogde ECM productie. Er is inderdaad aangetoond dat PPAR γ agonisten fibronectine expressie, geïnduceerd door TGF- β 1, remmen in glomerulaire mesangimale cellen (94). De agonist pioglitazone inhibeert dan ook in muis mesangimale cellen TGF- β 1 geïnduceerde fibronectine expressie door AP-1 activiteit te inhiberen en was afhankelijk van PPAR γ . Een natuurlijke ligand, 15-Deoxy- Δ 1214-prostaglandine J kon lagere fibronectine expressie in deze cellen op twee manieren bewerkstelligen. Ten eerste via onderdrukking van door TGF- β 1 geactiveerde AP-1 en ten tweede door TGF- β 1 geïnduceerde MAPK activering. Crosstalk tussen PPAR γ en Smad zouden ook betrokken kunnen zijn in de remmende effecten van PPAR γ liganden (95, 96).

Lipofibroblasten zijn zoals genoemd belangrijk voor de normale longontwikkeling en homeostase. Zij sturen weer andere cellen aan voor verdere ontwikkeling. Zo stimuleren zij bijvoorbeeld surfactantproductie in type II pneumocyten, wat ook essentieel is in longontwikkeling. Door transdifferentiatie stagneert wellicht de verdere longontwikkeling, waardoor alveolarisatie niet volledig wordt bewerkstelligd.



Hoofdstuk 7. COPD: een ziekte met emfyseem en verhoogde TGF- β expressie

COPD is een longziekte die in 80% van de gevallen door sigarettenrook wordt veroorzaakt. De ziekte openbaart zich vaak na het veertigste levensjaar en wordt gekenmerkt door chronische bronchitis en/of longemfyseem. Echter minder dan 20% van de rokers ontwikkelt COPD (97). Er wordt gedacht dat genetische predispositie of verminderde longontwikkeling kan verklaren waarom slechts 20% van de rokers COPD ontwikkelt. Naast sigarettenrook zijn andere soorten irritanten zoals vervuiling, stof of chemicalen, in 15% van de gevallen verantwoordelijk voor de ontwikkeling van COPD. α -1-antitrypsine-deficiëntie, de anti-protease van onder andere MMP-12, zorgt in de overige gevallen voor COPD (98).

Bij emfyseem worden de alveolaire wanden afgebroken, waardoor ze hun elasticiteit en vorm verliezen. Naast emfyseem wordt er in de luchtwegen van COPD patiënten tevens fibrose waargenomen (99). Het emfyseem wordt vooral gezien in de bronchiolen zonder kraakbeen en submucosale klieren, ter hoogte van de alveoli. Hier vindt ook de chronische ontsteking plaats met infiltratie van vele immuuncellen. Fibrose evenals kleine toenames in alveolaire macrofagen en interstitiële immuuncellen (100-102) vindt plaats in de kleine luchtwegen die daarboven gelegen zijn.

Net als in een embryo dat blootgesteld is aan sigarettenrook, wordt bij rokende COPD patiënten een verhoging van TGF- β waargenomen. Dit geldt zowel voor de bovenste luchtwegen waar fibrose optreedt als de onderste luchtwegen waar emfyseem plaatsvindt. Naast emfyseem is er bij COPD echter ook sprake van chronische bronchitis. Deze chronische bronchitis komt vooral voor op de plaatsen waar ook het emfyseem voorkomt en gaat gepaard met remodelering en infiltratie van allerlei immuuncellen, waaronder neutrofielen en macrofagen (103). Vooral neutrofielen blijken een belangrijke rol te spelen in het ziekteproces van COPD. Deze immuuncellen, alsook macrofagen en epitheelcellen, scheiden proteases uit zoals matrix metalloproteinasen en neutrofiel elastase wat elastinedegradatie en emfyseem kan veroorzaken (14, 103-104). Neutrofiel elastase is daarnaast al genoemd in zijn inhiberende rol bij tropoelastine afzet. Epitheelcellen en macrofagen scheiden ook TGF- β uit, wat fibroblast proliferatie stimuleert, waardoor weer ECM componenten geproduceerd kunnen worden. Hoewel er dus een verhoogde TGF- β expressie wordt waargenomen in COPD patiënten, wat geassocieerd wordt met ECM productie en ECM productie toeneemt als gevolg van de inflammatoire reactie, wordt COPD geassocieerd met emfyseem. Naast ECM afzetting, gaat COPD echter ook gepaard met inflammatie, gekenmerkt door infiltratie van immuuncellen die proteases afzetten en met stimulatie van protease uitscheiding.



7.1 Ontwikkeling van de longen

Mogelijk begint het ziekteproces van COPD met TGF- β inductie door sigarettenrook, al tijdens de ontwikkeling van de longen. Blootstelling aan sigarettenrook tijdens embryonale ontwikkeling leidt tot oxidatieve stress en meer histone acetylering, waardoor expressie van pro-inflammatoire genen wordt aangepast en vastgelegd. Mogelijk leidt blootstelling aan sigarettenrook tot hogere aantallen CD11b makers op macrofagen, wat ook gezien wordt bij macrofagen van COPD patiënten ten opzichte van gezonde, niet-rokende mensen (105). Hogere CD11b expressie wordt geassocieerd met ernstige achteruitgang van longfunctie. Daarnaast worden hogere TGF- β concentraties tijdens de ontwikkeling geassocieerd met hogere emfyseemgehaltenes in babylongen. Mogelijk leidt slechte ontwikkeling van alveoli en slechte initiële structuur van de alveoli tot een vergrote gevoeligheid voor emfyseemontwikkeling. Tijdens de ontwikkeling kan nicotine uit sigarettenrook daarnaast mogelijk zorgen voor LIF-MYF transdifferentiatie, wat wellicht de verdere alveolarisatie doet stagneren. Bovendien bestaat de hypothese dat remodelering in de long tijdens ontwikkeling bijdraagt aan hogere luchtweggevoeligheid en hogere kans op chronische ontsteking (106). Al met al zouden het aanwakkeren van genexpressie van pro-inflammatoire genen, hogere CD11b expressie, slechte vorming en ontwikkeling van alveoli, LIF-MYF transdifferentiatie en hogere luchtweggevoeligheid kunnen bijdragen aan ontwikkeling van COPD.

7.2 Genetische predispositie

Polymorfismes van fibrillin-1, latent TGF- β -binding protein 4 in het TGF- β pad en matrix metalloprotease (MMP) genen zijn bekend in mensen met emfyseem (107-109). Daarnaast zijn mutaties in endogline, een proteoglycaan die signaleringsfuncties in de TGF- β weg moduleert, gevonden bij mensen met COPD of pulmonaire telangiectasia (110). Deze genoemde polymorfismes zijn mogelijk betrokken bij de ontwikkeling of het in stand houden van de ECM in de longen. Wanneer dit niet goed verloopt, zou emfyseem kunnen ontstaan.

Een ander gen dat mogelijk betrokken is bij ontwikkeling van COPD, is ADAM33. Dit gen is waarschijnlijk betrokken bij luchtweggevoeligheid (111-113). ADAM33 heeft ten eerste mogelijk een rol in het vertakkingproces van de longen van muizen, aangezien mRNA expressie aangeschakeld wordt aan het begin van vertakking (114). Daarna verhoogt de expressie van ADAM33 tijdens de zwangerschap en blijft het aanwezig tot in de volwassen long (115). TGF- β en BMP zouden ADAM33 expressie kunnen verhogen als gevolg van het differentiatietraject van primitieve luchtwegmesenchymcellen tot myofibroblasten, welke belangrijk zijn in chronische wondherstellingsprocessen (116). ADAM33 zou daarnaast ook een belangrijke cytokine-stimulerende werking kunnen hebben die de ontstekingsreactie in COPD kan aanwakkeren.



Sigarettenrook kan zoals in hoofdstuk 5 besproken, daarnaast leiden tot AGE vorming. De activering van RAGE is mogelijk relevant in het langdurige inflammatieproces van COPD. Er is aangetoond dat accumulatie van AGEs kan leiden tot hogere TGF- β 1 expressie, connective tissue growth factor (CTGF), Fn mRNA expressie, radicaalvorming en lagere glutathionconcentraties in sommige cellijnen (77). Voor sigarettenrook is aangetoond dat het de vorming van reactieve zuurstofradicalen en apoptose in menselijke bronchiale epitheelcellen stimuleert en remodeleringsfactoren zoals TGF- β 1, epidermal growth factor en cyclin-dependent kinase inhibitor activeert. Er is ook aangetoond dat TGF- β kan zorgen voor oxidatieve stress. Een lagere expressie van en polymorfismes in (79) anti-oxidant enzymen (glutathion S-transferase P1, glutathion S-transferase M1, microsomal epoxide hydrolase en TIMP-2) en een hogere expressie van chemokines (IL-1 β , IL-8, growth-related oncogene- α en monocyte chemotactic protein-1) wordt in COPD waargenomen ten opzichte van gezonde mensen die niet rookten (117).

Samengevat kan aanwakking van genexpressie van pro-inflammatoire genen, hogere CD11b expressie, slechte vorming en ontwikkeling van alveoli, LIF-MYF transdifferentiatie en hogere luchtweggevoeligheid, afwijkingen ontstaan in embryogenese, bijdragen aan ontwikkeling van COPD. Ook kunnen mutaties in genen betrokken bij ECM ontwikkeling, radicaalwegvang, inflammatie en luchtweggevoeligheid bijdragen aan verminderde ontwikkeling van longen en aan het ziekteproces van COPD op late leeftijd.



Conclusie / discussie

Componenten of metabolieten uit sigarettenrook kunnen over de placenta vanuit de moeder naar het embryo worden vervoerd. Deze stoffen, met nicotine als een belangrijke daarvan, kunnen vervolgens de ontwikkeling van het embryo beïnvloeden. Ontwikkeling van de longen wordt zo ook beïnvloed en blootstelling aan rook blijkt een negatief effect te hebben op longfunctie, longvolume en alveolarisatie. In de ontwikkeling van de longen is TGF- β essentieel en TGF- β productie neemt toe als gevolg van roken. Mogelijk vindt dit plaats via nicotine uit sigarettenrook die aangrijpt op de acetylcholine $\alpha 7$ receptor. TGF- β familieleden zijn betrokken bij proliferatie, apoptose, differentiatie en migratie en spelen op deze manier een essentiële rol in de ontwikkeling van de longen. Daarnaast is TGF- β betrokken in oxidatieve stress en inflammatoire reacties.

TGF- β is zoals genoemd betrokken bij allerlei processen. Zo stimuleert het de vorming van alveoli. Voor alveolarisatie is ECM productie nodig en dit wordt gestimuleerd door TGF- β . Een protease / anti-protease balans is essentieel voor behoud van ECM, mogelijk ook in embryogenese. TGF- β remt proteases en een hogere TGF- β concentratie gaat gepaard met hogere anti-protease concentraties. Vorming van een goed gestructureerde ECM is essentieel voor alveolarisatie om een schavot te hebben waarvandaan de omgevingssignalen geboden kunnen worden die alveolaire voorlopercellen nodig hebben om het correcte fenotype aan te nemen en/of een herstelproces in te zetten. Mogelijk leiden overmatige stimulatie van alveolarisatie en genetische afwijkingen tot een minder goed schavot. Dit, in combinatie met overgevoeligheid van de longen, is wellicht verantwoordelijk voor hogere gevoeligheid voor ontwikkeling van ziektes waarbij ECM productie en afbraak in disbalans is, zoals bij COPD.

Door blootstelling aan sigarettenrook vindt er ook inflammatie plaats, waardoor infiltratie van immuuncellen plaatsvindt en proteases geproduceerd worden. Dit proces is waarschijnlijk betrokken bij COPD en kan zijn wortels hebben in embryogenese. In embryogenese vindt namelijk chromatine remodelering bij pro-inflammatoire genen, met als gevolg stimulatie van deze genen, plaats onder invloed van sigarettenrook. Mogelijk heeft ook hogere CD11b expressie bij macrofagen, wat geassocieerd wordt met ernstige achteruitgang van longfunctie, zijn wortels in embryogenese. Bij COPD is er sprake van emfyseem en/of chronische bronchitis. 80% van de COPD patiënten rookt en sigarettenrook verhoogt de productie van TGF- β . TGF- β zorgt op zijn beurt weer voor ECM verdikking, wat ook te zien is in de bovenste luchtwegen van COPD patiënten. Sigarettenrook heeft echter tevens een chemotaxische werking op immuuncellen, wat leidt tot macrofaag- en neutrofielinfiltratie, met als gevolg zowel verhoogde protease activiteit, betrokken bij ECM afbraak. Ook bevordert sigarettenrook de vorming van AGEs, moleculen die mogelijk de chronische ontsteking bevorderen. Al met al lijkt een chronische, ernstige blootstelling aan sigarettenrook te leiden tot ernstige inflammatie, met name in de kleinste longstructuren. Dit leidt tot degradatie van de ECM en emfyseem.



Een mogelijke andere verklaring voor verminderde alveolarisatie door blootstelling aan sigarettenrook is de transdifferentiatie van lipofibroblasten naar myofibroblasten. Nicotine uit sigarettenrook verstoort de PTHrP-gedreven alveolaire epitheel-mesenchymale paracriene signaleringsweg, resulterend in transdifferentiatie van pulmonaire lipofibroblasten (LIFs) naar myofibroblasten (MYFs). Dit gaat gepaard met verhoogde ECM productie door grotere aantallen MYFs en mogelijk door stimulatie van moleculen in het TGF- β signaleringspad. Lipofibroblasten zijn belangrijk voor de normale longontwikkeling en homeostase. Door transdifferentiatie naar myofibroblasten stagneert wellicht de verdere longontwikkeling, waardoor alveolarisatie niet volledig wordt bewerkstelligd.

Al met al zorgen sigarettenrook en nicotine voor de hogere TGF- β concentraties in de longen. Hoewel TGF- β ECM verdikking en alveolarisatie stimuleert, is het uiteindelijke effect van sigarettenrook op longontwikkeling een lagere alveolarisatie en een dunnere ECM. Mogelijk spelen verstoorde ECM structuur in schavotvorming bij alveolarisatie en transdifferentiatie van lipofibroblasten naar myofibroblasten hierbij een cruciale rol. Genexpressie van pro-inflammatoire genen, hogere CD11b expressie, slechte vorming en ontwikkeling van alveoli, LIF-MYF transdifferentiatie en hogere luchtweggevoeligheid, afwijkingen ontstaan in embryogenese, bijdragen aan ontwikkeling van COPD.



Referenties

Figuur voorpagina (binnenzijde voorpagina)

http://www.hf-pct.nhs.uk/graphics/localservices/smoking_mother.gif

- (1) Donnenfeld AE, Pulkkinen A, Palomaki GE, Knight GJ, Haddow JE. 1993. Simultaneous fetal and maternal cotinine levels in pregnant women smokers. *Am. J. Obstet. Gynecol* 168:781-2.
- (2) Stick SM, Burton PR, Gurrin L, Sly PD, LeSouëf PN. 1996. Effects of maternal smoking during pregnancy and a family history of asthma on respiratory function in newborn infants. *Lacet* 348:1060-4.
- (3) Lødrup Carlsen KC, Jaakkola JJ, Nafstad P, Carlsen KH. 1997. In utero exposure to cigarette smoking influences lung function at birth. *Eur. Respir. J.* 10:1774-9.
- (4) Hanrahan JP, Tager IB, Segal MR, Tosteson TD, Castile RG, Van Vunakis H, Weiss ST, Speizer FE. 1997. The effect of maternal smoking during pregnancy on early infant lung function at birth. *Eur. Respir. J.* 10:1129-35.
- (5) Tager IB, Ngo L, Hanrahan JP. 1995. Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:977-83.
- (6) Collins MH, Moessinger AC, Kleinerman J, Bassi J, Rosso P, Collins AM, James LS, Blanc WA. 1985. Fetal lung hypoplasia associated with maternal smoking: a morphometric analysis. *Pediatr. Res.* 19:408-12.
- (7) Vidic B. 1991. Transplacental effect of environmental pollutants on interstitial composition and diffusion capacity for exchange of gases of pulmonary parenchyma in neonatal rat. *Bul. Assoc. Anat.* 75:153-5.
- (8) Ji CM, Royce FH, Truong U, Plopper CG, Singh Gurmukh, Pinkerton KE. 1998. Maternal exposure to environmental tobacco smoke alters Clara cell secretory protein expression in fetal rat lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 275:L870-76.
- (9) Richter A, O'Donnell RA, Powell RM, Sanders MW, Holgate ST, Djukanovic R, Davies DE. 2002. Autocrine ligands for the epidermal growth factor receptor mediate interleukin-8 release from bronchial epithelial cells in response to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:85-90.
- (10) Marwick JA, Kirkham P, Gilmour PS, Donaldson K, MacNEE W, Rahman I. 2002. Cigarette smoke-induced oxidative stress and TGF-beta1 increase p21waf1/cip1 expression in alveolar epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci.* 973:278-83.
- (11) Alberts B, Johanson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell* fourth edition. Chapter 21.
- (12) Alberts B, Johanson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell* fourth edition. Figure 21.17.
- (13) Shi W, Bullesci S, Warburton D. 2007. Lung development and Adult Lung Diseases. *American college of CHEST physicians* 132:651-656.
- (14) Roberts AB, Sporn MB. 1990. The TGF-bs. In *Peptide Growth Factors and Their Receptors, Part I*. Springer-Verlag, Berlin 95:419-472.
- (15) Burri PH. 2006. Structural aspects of Postnatal Lung Development – Alveolar Formation and Growth. *Biology of the Neonate* 89:313-322.
- (16) Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. 2000. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev* 92:55-81.
- (17) Warburton D, Bellusci S, De Langhe S, Del Moral PM, Fleury V, Mailleux A, Tefft D, Unbekandt M, Wang K, Shi W. 2005. Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis. *Pediatr Res* 57:26R-37R
- (18) Warburton D, Bellusci S, Del Moral PM, Kaartinen V, Lee M, Tefft D, Shi W. 2003. Growth factor signaling in lung morphogenetic centers: automaticity, stereotypy and symmetry. *Respir Res* 4:5



- (19) Jesudason EC, Smith NP, Connell MG, Spiller DG, White MR, Fernig DG, Losty PD. 2005. Developing rat lung has a sided pacemaker region for morphogenesis-related airway peristalsis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:118–127.
- (20) Burri PH. 1984. Fetal and postnatal development of the lung. *Annu Rev Physiol* 46:617–628.
- (21) Weibel ER. 2008. How to make an alveolus. *Eur Respir J* 31:483–485.
- (22) Massaro D, Teich N, Maxwell S, Massaro GD, Whitney P. 1985. Postnatal development of alveoli. Regulation and evidence for a critical period in rats. *J Clin Invest* 76:1297–1305.
- (23) http://www.biology.arizona.edu/chh/problem_sets/lung_toxicology/graphics/alveolus_Xsection.gif
- (25) Piek E, Heldin C, Ten Dijke P. 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *13:2105–2124*.
- (25) Massague J, Pandiella A. 1993. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 62:515–541.
- (26) <http://genesdev.cshlp.org/content/19/23/2783/F2.large.jpg>
- (27) Moustakas A, Heldin CH. 2005. Non-Smad TGF- β signals. *Journal of Cell Science* 118:3573–3584. (28) Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. 1997. TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development* 124:2659–2670.
- (29) Heine UI, Munoz EF, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB. 1990. Colocalization of TGF- β 1 and collagen I and III, fibronectin and glycosaminoglycans during lung branching morphogenesis. *Development* 109:29–36.
- (30) Schmid P, Cox D, Bible G, Maier R, McMaster GK. 1991. Differential expression of TGF β 1, β 2, and β 3 genes during mouse embryogenesis. *111:117–130*.
- (31) Serra R, Pelton RW, Moses HL. 1994. TGF β 1 inhibits branching morphogenesis and N-myc expression in lung bud organ cultures. *Development* 120:2153–2161.
- (32) Zhao J, Bu D, Lee M, Slavkin HC, Hall FL, Warburton D. 1996. Abrogation of TGF- β type II receptor stimulates embryonic mouse lung branching morphogenesis in culture. *Dev Biol* 180:242–257.
- (33) Nelson TR, Manchester DK. 1988. Modeling of lung morphogenesis using fractal geometries. *IEEE Trans. Med. Imaging* 7:321–327.
- (34) Zhao J, Sime PJ, Bringas P Jr, Gaudie J, Warburton D. 1998. Epithelium-specific adenoviral transfer of a dominant-negative mutant TGF- β type II receptor stimulates embryonic lung branching morphogenesis in culture and potentiates EGF and PDGF-AA. *Mech Dev* 72:89–100.
- (35) Beers MF, Solarin KO, Guttentag SH, Rosenbloom J, Kormilli A, Gonzales LW, Ballard PL. 1998. TGF- β 1 inhibits surfactant component expression and epithelial cell maturation in cultured human fetal lung. *Am J Physiol* 275:L950–L960.
- (36) Whitsett JA, Weaver TE, Lieberman MA, Clark JC, Daugherty C. 1987. Differential effects of epidermal growth factor and TGF-beta on synthesis of Mr = 35, 000 surfactant-associated protein in fetal lung. *J Biol Chem* 262:7908–7913.
- (37) Zhou L, Dey CR, Wert SE, Whitsett JA. 1996. Arrested lung morphogenesis in transgenic mice bearing an SP-C-TGF β 1 chimeric gene. *Dev Biol* 175:227–238.
- (38) Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. 1993. TGF- β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:770–774.
- (39) Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. 1992. Targeted disruption of the mouse TGF- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693–699.



- (40) Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J. 1995. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interactions. *Nat Genet* 11:415–421.
- (52) Vojtek AB, Cooper JA. 1995. Rho family members: activators of MAP kinase cascades. *Cell* 82:527–529.
- (56) Hayden MR, Sowers JR, Tyagi SC. 2005. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. *Cardiovascular Diabetology* 4:9.
- (41) Lee CG, Cho SJ, Kang MJ, Chapoval SP, Lee PJ, Noble PW, Yehualaeshet T, Lu B, Flavell RA, Milbrandt J, Homer RJ, Elias JA. 2004. Early Growth Response Gene 1–mediated Apoptosis Is Essential for Transforming Growth Factor β 1–induced Pulmonary Fibrosis. *J Exp Med* 200:377–389.
- (42) Shapiro SD. 1995. The pathogenesis of emphysema: the elastase: antielastase hypothesis 30 years later. *Proc Assoc AmPhysicians* 107:346–352.
- (43) Snider GL. 2000. Collagen versus elastin in the pathogenesis of emphysema. *Chest* 117:2445–2465.
- (44) Turino GM. 2002. The origins of a concept: the protease-antiprotease imbalance hypothesis. *Chest* 122:1058–1060.
- (45) Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A. 2004. Increased level of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 125:626–632.
- (46) Montuschi P, Collins JV, Ciabattini G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. 2000. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1175–1177.
- (47) Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. 2003. Oxidative stress in expired breath condensate of patients with COPD. *Chest* 124:1373–1380.
- (48) MacNee W, Rahman I. 2001. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends MolMed* 7:55–62.
- (49) Steven D, Shapiro MD. 2005. COPD Unwound. *N Engl J Med*. 19:2016–2019.
- (50) Noel NK. 2008. Current Literature Review. *J Sex Med* 5:16–20.
- (51) Ortiz LA, Lasky J, Hamilton RF Jr, Holian A, Hoyle GW, Banks W, Peschon JJ, Brody AR, Lungarella G, Friedman M. 1998. Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. *Exp Lung Res* 24:721–743.
- (53) Yi ES, Salgado M, Williams S, Kim SJ, Masliah E, Yin S, Ulich TR. 1998. Keratinocyte growth factor decreases pulmonary edema, TGF-beta and platelet-derived growth factor-BB expression, and alveolar type II cell loss in bleomycin-induced lung injury. *Inflammation* 22:315–325.
- (54) Marshall RP, McNulty RJ, Laurent GJ. 2000. Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type I receptor. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1999–2004.
- (55) Arai T, Abe K, Matsuoka H, Yoshida M, Mori M, Goya S, Kida H, Nishino K, Osaki T, Tachibana I, Kaneda Y, Hayashi S. 2000. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L914–L922.
- (57) Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. 2000. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 117:684–94.
- (58) Mercer PF, Shute JK, Bhowmik A, Donaldson GC, Wedzicha JA, Warner JA. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respir Res* 6:151–60.
- (59) Bracke K, Cataldo D, Maes T, Gueders M, Noël A, Foidart JM, Brusselle G, Pauwels RA. 2005. Matrix metalloproteinase-12 and cathepsin D expression in pulmonary macrophages and dendritic cells of cigarette smokeexposed mice. *Int Arch Allergy Immunol* 138:169–79.



- (60) Kazushi I, Dalal SS, Chen SE, Downey R, Larry LS, Ginsburg M, D'Armiento J. 2001. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 163:786–91.
- (61) Vernooij JH, Lindeman JH, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EF. 2004. Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest* 126:1802–10.
- (62) Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL, Barnes PJ, Donnelly LE. 2004. Sputum matrix metalloproteases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respir Res* 99:703–10.
- (63) Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AMG, Kobayashi DK, Kelley D, Belaouaj A. 2003. Neutrophil Elastase Contributes to Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *Am J Pathol* 163:2329-2335.
- (64) Alfandari D. 2005.. ADAM13 Function in Development. *Proteases in Biologie and Disease* 4:147-169.
- (65) Gill SE, Pape MC, Leco KJ. 2009. Absence of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 disrupts alveologenesis in the mouse. *Development Growth & Differentiation* 51:17-24.
- (66) Kang HR, Cho SJ, Lee CG, Robert JH, Elias JA. 2007. TGF- β 1 Stimulates Pulmonary Fibrosis and Inflammation Via a Bax- Dependent, Bid-activated Pathway That Involves Matrix Metalloproteinase-12. Manuscript M610764200. Laatste versie te vinden op <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M610764200>.
- (67) Neumann C, Yu A, Welge-Lüssen U, Lütjen-Drecoll E, Birke M. 2008. The effect of TGF-beta2 on elastin, type VI collagen, and compounds of the proteolytic degradation system in human optic nerve astrocytes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 49:1464-1472.
- (68) Bartram U, Speer CP. 2004. The role of Transforming Growth factor β in Lung Development and Disease. *Chest* 125:754-765.
- (69) A Churg, H Tai, T Coulthard, R Wang, JL Wright. 2006. Cigarette smoke drives small airway remodeling by induction of growth factors in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med*. 174:1327-34.
- (70) Kielty CM. 2006. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med*. 8:1-23.
- (71) Kucich U, Rosenbloom JC, Abrams WR, Rosenbloom J. 2002. TGF-beta stabilizes elastin mRNA by a pathway requiring active Smads, protein kinase C-delta, and p38. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 26:164-6.
- (72) Yang S, Nugent MA, Panchenko MP. 2008. EGF antagonizes TGF-beta-induced tropoelastin expression in lung fibroblasts via stabilization of Smad corepressor TGIF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295:L143-51.
- (73) <http://genesdev.cshlp.org/content/19/23/2783.full#ref-240>.
- (74) Chen H, Sun J, Buckley S, Chen C, Warburton D, Wang XF, Shi W. 2005. Abnormal mouse lung alveolarization caused by Smad3 deficiency is a developmental antecedent of centrilobular emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L683–L691.
- (75) Morbini P, Villa C, Campo I, Zorzetto M, Inghilleri S, Luisetti M. 2006. The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung disease? *Mod Pathol*. 19:1437-45.
- (76) Hao L, Noguchi S, Kamada Y, Sasaki A, Matsuda M, Shimizu K, Hiramatsu Y, Nakatsuka M. 2008. Adverse effects of advanced glycation end products on embryonal development. *Acta Med Okayama*. 62:93-9.
- (77) Yan HD, Li XZ, Xie JM, Li M. 2007. Effects of advanced glycation end products on renal fibrosis and oxidative stress in cultured NRK-49F cells. *Chin Med J (Engl)* 120:787-93.
- (78) Yokoi H, Sugawara A, Mukoyama M, Mori K, Makino H, Suganami T, Nagae T, Yahata K, Fujinaga Y, Tanaka I, Nakao K. 2001. Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: a potential target for preventing renal fibrosis. *Am J Kidney Dis* 38: 134-138.



- (79) Reynolds PR, Kasteler SD, Cosio MG, Sturrock A, Huecksteadt T, Hoidal JR. 2008. RAGE: developmental expression and positive feedback regulation by Egr-1 during cigarette smoke exposure in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294:L1094-101.
- (80) Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. 2008. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid Redox Signal.* 10:799-811.
- (81) Marwick JA, Kirkham PA, Stevenson CS, Danahay H, Giddings J, Butler K, Donaldson K, MacNee W, Rahman I. 2004. Cigarette smoke alters chromatin remodelling and induces pro-inflammatory genes in rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.*
- (82) Inoki K, Haneda M, Ishida T, Mori H, Maeda S, Koya D, Sugimoto T, Kikkawa R. 2000. Role of mitogen-activated protein kinases as downstream effectors of TGF-beta in mesangial cells. *Kidney Int* 77:S76-S80.
- (83) Hayashida T, Poncelet AC, Hubchak SC, Schnaper HW. 1999. TGF-beta1 activates MAP kinase in human mesangial cells: a possible role in collagen expression. *Kidney Int* 56:1710-1720.
- (84) Atfi A, Djelloul S, Chastre E, Davis R, Gespach C. 1997. Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J Biol Chem* 272:1429-1432.
- (85) Hartsough MT, Mulder KM. 1995. Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* 270:7117-7124.
- (86) Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishida M, Fujisawa J, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E. 1999. Involvement of the p38 mitogenactivated protein kinase pathway in TGF-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* 274:27161-27167.
- (87) Choi ME, Ballermann BJ. 1995. Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant TGF-beta receptors. *J Biol Chem* 270:21144-21150.
- (88) Maritz GS. 1988. Effect of maternal nicotine exposure on growth in vivo of lung tissue of neonatal rats. *Biol Neonate* 53:163-170.
- (89) Cheah FC, Pillow JJ, Kramer BW, Polglase GR, Nitsos I, Newnham JP, Jobe AH, Kallapur SG. 2009. Airway inflammatory cell responses to intra-amniotic lipopolysaccharide in a sheep model of chorioamnionitis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 296:L384-93.
- (90) Sekhon HS, Keller JA, Proskocil BJ, Martin EL, Spindel ER. 2002. Maternal nicotine exposure upregulates collagen gene expression in fetal monkey lung: association with $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26:31-41.
- (91) Wongtrakool C, Roser-Page S, Rivera HN, Roman J. 2007. Nicotine alters lung branching morphogenesis through the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293:L611-8.
- (92) Shan H, Zhang Y, Lu Y, Zhang Y, Pan Z, Cai B, Wang N, Li X, Feng T, Hong Y, Yang B. 2009. Downregulation of miR-113 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodelling in canines. *Cardiovasc Res.* Epub ahead of print.
- (93) Torday JS, Rehan VK. 2007. The evolutionary continuum from lung development to homeostasis and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 292:L608-11.
- (94) Torday JS, Torres E, Rehan VK. 2003. The role of fibroblast transdifferentiation in lung epithelial cell proliferation, differentiation and repair. *Pediatr Pathol Mol Med* 22:189-207.
- (94) Guo B, Koya D, Isono M, Sugimoto T, Kashiwagi A, Haneda M. 2004. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Ligands Inhibit TGF- β 1-Induced Fibronectin Expression in Glomerular Mesangial Cells. *Diabetes.* 53:200-8.
- (95) Zhang GY, Cheng T, Zheng MH, Yi CG, Pan H, Li ZJ, Chen XL, Yu Q, Jiang LF, Zhou FY, Li XY, Yang JQ, Chu TG, Gao WY. 2009. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits TGF-beta1 induction of connective tissue growth factor and extracellular matrix in hypertrophic scar fibroblasts in vitro. *Arch Dermatol Res.* Epub ahead of print.



- (96) Fu M, Zhang J, Lin Y, Zhu X, Zhao L, Ahmad M, Ehrenguber MU, Chen YE. 2003. Early stimulation and late inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) gene expression by transforming growth factor beta in human aortic smooth muscle cells: role of early growth-response factor-1 (Egr-1), activator protein 1 (AP1) and Smads. *Biochem J.* 370:1019–1025.
- (96) Tomek RJ, Rimar S, Eghbali-Webb M. 1994. Nicotine regulates collagen gene expression, collagenase activity, and DNA synthesis in cultured cardiac fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 136:97-103.
- (97) Sampsonas F, Kaparianos A, Lykouras D, Karkoulas K, Spiropoulos K. 2007. DNA sequence variations of metalloproteinases: their role in asthma and COPD. *Postgrad. Med. J.* 83:244-250.
- (98) Biedermann A de, Köhnlein T. 2006. Alpha-1-Antitrypsin-Mangel – eine versteckte Ursache der COPD. Überblick über Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie *Deutsches Aertzblatt* 103:26.
- (99) McGowan S, Jackson SK, Jenkins-Moore M, Dai HH, Chambon P, Snyder JM. 2000. Mice bearing deletions of retinoic acid receptors demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:162–167.
- (100) Cosio MG, Guerassimov A. 1999. Chronic obstructive pulmonary disease. inflammation of small airways and lung parenchyma, *Am J Respir Crit Care Med* 160:S21–S25.
- (101) Hyde DM, Plopper CG, Weir AJ, Murnane RD, Warren DL, Last JA, Pepelko WE. 1985. Last, Peribronchiolar fibrosis in lungs of cats chronically exposed to diesel exhaust, *Lab Invest* 52:195–206.
- (102) Tyler WS, Tyler NK, Last JA, Gillespie MJ, Barstow TJ. 1988. Comparison of daily and seasonal exposures of young monkeys to ozone, *Toxicology* 50:131–144.
- (103) Chen YG, Massague J. 1999. Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *J Biol Chem* 274:3672-3677.
- (104) Churg A, Wright JL. 2005. Proteases and emphysema. *Curr Opin Pulm Med* 11:153–159.
- (105) Löfdahl JM, Wahlström J, Sköld CM. 2006. Different inflammatory cell pattern and macrophage phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients, smokers and non-smokers. *Clin Exp Immunol.* 145:428–437.
- (106) Blacquièrre MJ, Timens W, Melgert BN, Geerlings M, Postma DS, Hylkema MN. 2009. Maternal smoking during pregnancy induces airway remodelling in mice offspring. *Eur Respir J.* 33:1133-40.
- (107) Kaartinen V, Warburton D. 2003. Fibrillin controls TGF- β activation. *Nat Genet* 33:331–332
- (108) Hersh CP, Demeo DL, Lazarus R, Celedón JC, Raby BA, Benditt JO, Criner G, Make B, Martinez FJ, Scanlon PD, Sciruba FC, Utz JP, Reilly JJ, Silverman EK. 2006. Genetic association analysis of functional impairment in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 173:977–984.
- (109) Joos L, He JQ, Shepherdson MB, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, Sandford AJ. 2002. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet* 11:569–576.
- (110) McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. 1994. Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8:345–351.
- (111) Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, McKenny J, Braunschweiger K, Walsh A, Liu Z, Hayward B, Folz C, Manning SP, Bawa A, Saracino L, Thackston M, Benchekroun Y, Capparell N, Wang M, Adair R, Feng Y, Dubois J, FitzGerald MG, Huang H, Gibson R, Allen KM, Pedan A, Danzig MR, Umland SP, Egan RW, Cuss FM, Rorke S, Clough JB, Holloway JW, Holgate ST, Keith TP. 2002. Association of the ADAM-33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 418:426-430.



- (112) Howard TD, Postma DS, Jongepier H et al. 2003. Association of a disintegrin and metalloprotease 33(ADAM33)gene with asthma in ethnically diverse populations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:717-722.
- (113) Wernar M, Herbon N, Gohlke H et al. 2004. Asthma is associated with single-nucleotide polymorphisms in ADAM 33. *Clin. Exp. Allergy* 34:26-31.
- (114) Gunn TM, Azarani A, Kim PH, Hyman RW, Davis RW, Barsh GS. 2002. Identification and preliminary characterization of mouse ADAM33. *BMC Genet.* 3:2.
- (115) Haitchi H, Powell RM, Wilson DI, Holgate ST, Davies DE. 2003. ADAM33 expression in embryonic mouse lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167:A377.
- (116) Wicks J, Powell RM, Richter A, Davies DE, Holgate ST. 2003. Transient upregulation of ADAM33 by TGF β precedes myofibroblast differentiation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167:A157.
- (117) Tomaki M, Sugiura H, Koarai A, Komaki Y, Akita T, Matsumoto T, Nakanishi A, Ogawa H, Hattori T, Ichinose M. 2007. Decreased expression of antioxidant enzymes and increased expression of chemokines in COPD lung. *Pulm Pharmacol Ther.* 20:596-605.