



rijksuniversiteit
groningen



umcg

De effecten van sigarettenrook op het bronchiaal epitheel van astmapatiënten

Een rol voor de Wnt// β -catenin pathway?

Bachelorscriptie
Korienke Smit
09 juli 2009
UMCG: Pathofysiologie – longen
Begeleidster: M. Broekema

- Inhoudsopgave	
- Inleiding	3
- Morfologie van bronchiaal epitheel	5
○ Gezond bronchiaal epitheel	5
○ Bronchiaal epitheel van astmapatiënten	7
○ Bronchiaal epitheel van rokers	8
○ Bronchiaal epitheel van rokende astmapatiënten	8
- De rol van Wnt/ β-catenin pathway in bronchiaal epitheel	10
○ Gezond bronchiaal epitheel	10
○ De invloed van Wnt/ β -catenin op het bronchiaal epitheel van astmapatiënten	11
○ De mogelijke rol van Wnt/ β -catenin op het bronchiaal epitheel van een roker	12
- Invloed van roken op Wnt/β-catenin pathway bij astmapatiënten	13
- Conclusie	14
- Referenties	15

Inleiding

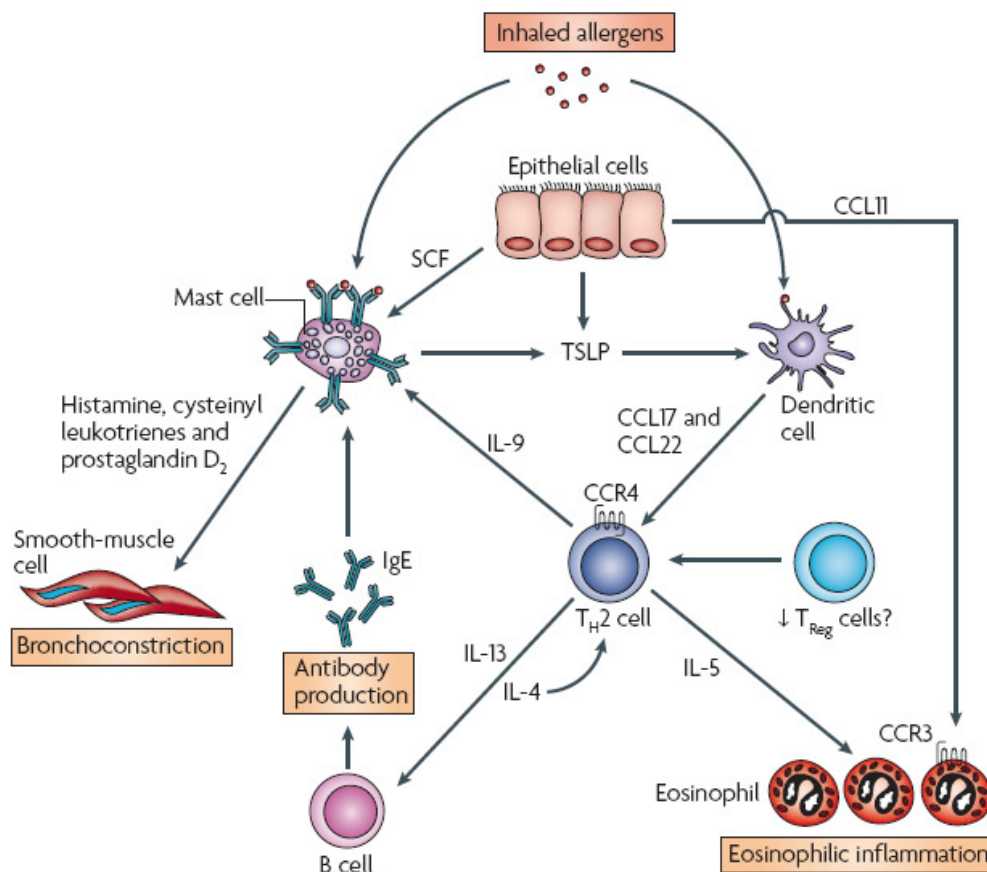
Astma is een longziekte, gekenmerkt door een chronische ontsteking en een reversibele luchtwegobstructie, die zowel een atopische als een niet-atopische oorzaak kan hebben. In atopische astma zijn de pathologische veranderingen van de luchtweg, geïnduceerd door een ontstekingsproces, een resultaat van specifieke reacties tegen allergeen blootstelling (Barnes, 2008; Holgate, 2008). Na blootstelling aan het allergeen treedt er een acute ontstekingsreactie op die kenmerkend is voor een type 1 hyperreactiviteit reactie (Holgate, 2008). Door de allergenen worden mestellen, dendritische cellen en epitheelcellen geactiveerd die vervolgens verschillende mediators vrijlaten of activeren. Mestcellen laten mediators vrij die onder andere bronchoconstrictie induceren, epitheelcellen laten *stem-cell factor* (SCF) vrij die mestcellen activeren en dendritische cellen. De dendritische cel wordt gestimuleerd door *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), afkomstig van mest- en epitheelcellen, waardoor de dendritische cel allergenen gaat bewerken en chemokines vrijlaat. De chemokines grijpen aan op CC-chemokine receptor 4 (CCR4) die T-helper 2 (Th₂) cellen activeert (Barnes, 2008; Holgate, 2008). De Th₂ – cellen produceren verschillende interleukines (IL); IL-13, IL-4, IL-5, IL-9. Deze interleukines hebben verschillende effecten, onder andere stimulering van B-cellen tot het synthetiseren van IgE, activering van eosinofiele inflammatie en stimulering van mestcel proliferatie. Gespeculeerd wordt dat de verergerde ontstekingsreactie in astmapatiënten het gevolg is van een defect aan hun regulatoire T-cellen, wat zorgt voor een disbalans tussen Th₁ / Th₂ in het voordeel van Th₂. Zie figuur 1 voor een overzicht van het ontstekingsproces bij atopische astma (Barnes PJ, 2008). Eosinofielen worden gerekruteerd na CCL11, afkomstig van epitheelcellen, binding aan CCR3 op eosinofielen (Barnes, 2008).

Astma wordt gekenmerkt door verschillende symptomen zoals: hoesten, kortademigheid, beklemmend gevoel op de borst, piepende ademhaling (*wheezing*) en afnemende longfunctie (*Astmafonds*). Deze symptomen worden veroorzaakt doordat allergenen een ontstekingsreactie induceren, wat leidt tot luchtwegobstructie, hyper bronchiale reactiviteit en remodelering van onder andere het epitheel (veranderingen in structuur van het weefsel) (Holgate et al., 1999).

Naast astma heeft ook roken een negatieve invloed op de longen. In 2006 rookten in Nederland 28% van de volwassenen (RIVM). Door roken hebben mensen een verhoogde kans tot ontwikkeling van longkanker of COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) (Hecht et al., 1994). In sigarettenrook bevinden zich namelijk schadelijke stoffen die het epitheel beschadigen en verantwoordelijk zijn voor remodelering van het epitheel door middel van een ontstekingsproces (Gangl et al., 2004; Hecht et al., 1994). Uit het onderzoek van St-Laurent et al., 2008 en volgt dat het ziekteproces van astma verergerd wordt door sigarettenrook. Actief roken wordt geassocieerd met een toename van de ernstigheid van astma klachten ten op zichte van niet rokende astmapatiënten, verslechtering van longfunctie, verminderde gevoeligheid voor corticosteroïden, kortademigheid en abnormaal ademhalingspatroon nemen toe en rokende astmapatiënten hebben meer astma-aanvallen (Chaudhuri et al., 2005; St-Laurent et al., 2008). Ook neemt door roken het aantal dodelijke astma slachtoffers toe (Siroux et al. 2000). Uit het onderzoek van Eisner et al 2001, waarin ze keken naar de frequentie rokende astmapatiënten en gezonde rokers, volgt dat de frequentie rokers onder astmapatiënten gelijk is aan het aantal gezonde rokers.

Veel onderzoek is er al gedaan naar het ziekteproces van astma en naar de invloed van roken op het bronchiaal epitheel. Men heeft zich echter nog afzijdig gehouden van veelvuldig onderzoek naar de effecten van roken op het remodeleringsproces bij astmapatiënten. In deze scriptie wordt gekeken naar de effecten van sigarettenrook op het bronchiaal epitheel van astmapatiënten.

Eerst wordt de morfologie van gezond bronchiaal-epitheel vergeleken met de morfologie van het bronchiaal-epitheel van astmapatiënten en rokers, gekeken wordt hierbij naar veranderingen die optreden ten opzichte van gezond bronchiaal-epitheel. Daarna wordt beschreven wat de mogelijke invloed van het Wnt/β-catenin pathway is op het ontstaan van de morfologische veranderingen. Tenslotte wordt een voorstel gedaan voor een vervolgonderzoek, waarin wordt gekeken naar de invloed van sigarettenrook op het Wnt/β-catenin pathway in het bronchiaal-epitheel van astmapatiënten.



Figuur 1. Ontstekingscel- en immuuncel betrokken bij astma. Ingehaalde allergenen activeren mest cellen en laten verschillende bronchoconstrictor mediators vrij. Epitheelcellen laten stem-cell factor (SCF) vrij. Allergenen worden bewerkt door dendritische cellen, die onder invloed van thymic stromal lymphopoietin (TSLP) staan, wat uitgescheiden wordt door epitheelcellen en mestcellen. TSLP zorgt ervoor dat dendritische cellen chemokines vrijlaten die aangrijpen op CC-chemokine receptor 4 (CCR4) wat T-helper 2 (Th₂) cellen activeert. Th₂ cellen hebben een belangrijke rol bij het aansturen van het ontstekingsproces. Deze cellen zijn betrokken bij het vrijlaten van Interleukine 4 (IL-4) en IL-13 (stimuleert B-cellen tot het synthetiseren van IgE), IL-5 (noodzakelijk voor eosinofiel inflammatie) en IL-9 (stimuleert mestcel proliferatie). Epitheelcellen laten CCL11 vrij die eosinofielen rekruteert via CCR3. Patiënten met astma hebben een defect in regulator T (T_{reg}) cellen, wat ervoor zorgt dat de Th₁/ Th₂ – balans nog meer naar de Th₂ kant gaat (Barnes, 2008).

Morfologie van bronchiaal epitheel

Epitheelcellen bedekken veel lichaamsholten waarbij ze betrokken zijn bij de regulatie van verschillende processen. Zo fungeren epitheelcellen als barrière doordat ze een afscheiding vormen tussen het interne en het externe milieu, waardoor allergenen uit het externe milieu worden tegengehouden (*Jong de et al., 1994*). Ook kunnen epitheelcellen een rol spelen bij ontstekingsreacties. Zo kunnen epitheelcellen worden gestimuleerd door verschillende pro-inflammatoire mediators, die door specifieke en niet-specifieke stimuli zijn geactiveerd, wat leidt tot de uitscheiding van verschillende mediators (*Jong de et al., 1994*). Deze mediators zijn onder andere stikstofoxide (NO) en cytokines, die een tonus in de gladde spieren kunnen induceren, het transport van ionen reguleren, slijmproductie door slijmproducerende cellen (mucous cells) induceren en ze hebben een rol bij het reguleren van het ontstekingsproces (*Jong de et al., 1994*). Verlies van epitheelcellen heeft pathologische consequenties, zie bijvoorbeeld bronchiaal epitheel van astmapatiënten en rokers. Om deze pathologische consequenties beter te begrijpen, zodat er beter ingegrepen kan worden bij beschadigingen, is kennis over de morfologie van het bronchiaal epitheel nodig. In de volgende deelhoofdstukken wordt beschreven hoe de morfologie is onder gezonde omstandigheden, bij astmapatiënten, bij rokers en bij rokende astmapatiënten.

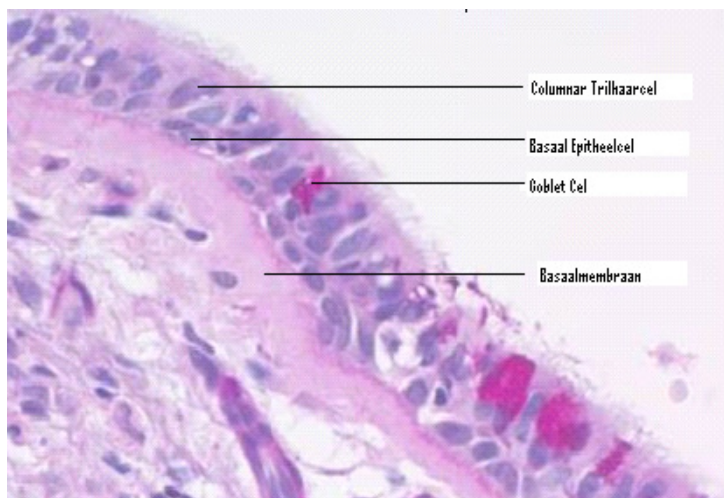
- Gezond bronchiaal epitheel

Het epitheel is uit meerdere lagen opgebouwd, basale laag, columnar laag en basaal membraan. Tegen het basaal membraan aan ligt een basale laag, waarin de basale epitheelcellen vastgehecht zijn aan het basaal membraan, door middel van desmosoom en hemidesmosoom aanhechtingen (niet weergegeven) (*Longziekten*). Een belangrijke rol voor basale epitheelcellen is zorgen voor oppervlaktevergroting van de epitheel laag zodat 'columnar cells' goed kunnen aanhechten (*Longziekten*).

Boven de basale laag ligt de columnar cel laag, één laag van grote verschillende cellen, waarin de cellen grotendeels niet verbonden zijn met het basaal membraan, maar stevig vastgezet zijn door aanhechting aan de basale laag. In deze laag bevinden zich verschillende soorten secretoire cellen: Goblet cellen en Clara cellen, zie figuur 2 voor een schematisch overzicht van de aanwezige cellen in de verschillende epitheelagen (*Longziekten; Broekema et al., ongepubliceerd*).

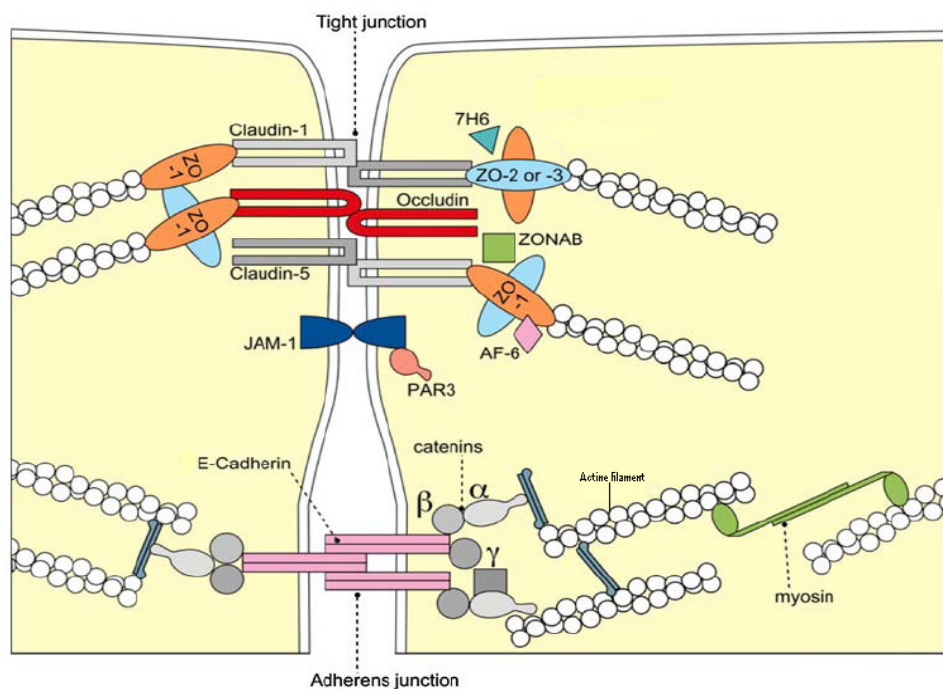
Goblet cellen (slijmbeker cellen of mucus producerende cellen) zijn cellen die granules bevatten die slijm kunnen uitscheiden na activering door een prikkel, bijvoorbeeld stof of sigarettenrook, zie figuur 2 (*Longziekten*). Clara cellen, géén slijmproducerende of trilhaar bevattende cellen, zijn epitheelcellen met microvilli die zich op het oppervlak van het lumen van de kleine luchtwegen bevinden (*Atkinson et al., 2008*). Clara cellen fungeren als beschermers van het bronchiaal epitheel; ze zijn de epitheel progenitor cellen in de kleine luchtwegen, na beschadiging aan het epitheel kunnen deze cellen prolifereren en migreren na de plaats van beschadiging, waar ze de schade herstellen (*Atkinson et al., 2008*). Ook zijn Clara cellen verantwoordelijk voor de uitscheiding van componenten voor *surfactant*, wat belangrijk is voor de elasticiteit van de long (*Lumsden et al., 1984*).

Columnar trilhaar cellen zijn de meest voorkomende cellen van het epitheel. Deze cel bedekt het grootste gedeelte van de binnenkant van het lumen van de kleine luchtwegen, zie figuur 2. De trilharen hebben een regulatoire functie, ze zorgen voor slijmtransport naar de larynx, ook zijn ze betrokken bij vloeistof en iontransport naar het lumen (*Longziekten*).



Figuur 2. Schematisch overzicht van cellen in het bronchiaal epitheel (*Broekema et al., ongepubliceerd*).

In het columnar epitheel bevinden zich verschillende structuren die ervoor zorgen dat de cellen netjes tegen elkaar aan blijven zitten, zie figuur 3. *Tight junctions* (TJ) zijn verantwoordelijk voor de integriteit van de bovenste laag epitheelcellen (apical border). Tot de TJ transmembraan-eiwitten worden gerekend: occludin, claudin familie en Junctional Adhesion Molecule – 1 (JAM-1). De transmembraan-eiwitten zijn verantwoordelijk voor de aanhechting van cellen in de bovenste laag (Boer de, et al., 2008; Förster et al., 2008). De ruimte tussen cellen wordt dichtgemaakt waardoor er een barrière wordt gevormd en transport van ionen en vloeistof in de intracellulaire ruimte gemedieerd kan worden (Förster et al., 2008). Zonna occludens (ZO-1 en ZO-2) zijn eiwitten in het cytoplasma die betrokken zijn bij de aanhechting van de transmembraan-eiwitten aan het actine filament, wat zorgt voor stabiliteit van het epitheel (Boer de, et al., 2008; Förster et al., 2008).



Figuur 3. Schematisch overzicht van tight junctions en adherens junctions. Via claudin, occludin en JAM-1 transmembraan-eiwitten worden cellen, aan de apicale kant, aan elkaar gehecht. Zonna-occludens eiwitten (ZO-1 en ZO-2) zorgen ervoor dat tight junctions aan het actine filament worden vastgemaakt. Bij adherens junctions worden cellen aan elkaar vastgemaakt met behulp cadherins (E-cadherin). In het cytoplasma zorgen catenins (α - en β -catenin) er voor dat cadherins aan het actine cytoskelet worden gekoppeld. (Förster et al., 2008).

Adhesion junctions (AJ) zijn gespecialiseerde structuren die functioneren als mediators van de cel-cel adhesie, zie figuur 3. De epitheelcellen, basaal gelegen, worden aan elkaar vastgemaakt met behulp van transmembraan-eiwitten, cadherins (Förster et al., 2008). E-cadherin, hoofdzakelijk aanwezig in het epitheel, heeft een domein in de extracellulaire ruimte en een domein (de staart) in het cytoplasma (Kowalczyk et al., 2004). Aan de staart van E-cadherin bindt β -catenin, zie figuur 3 (Orford et al., 1999; Förster et al., 2008). Vervolgens bindt α -catenin aan β -catenin en koppelt zo het gevormde E-cadherin/ β -catenin/ α -catenin complex aan het actine cytoskelet, waardoor stabiele cel-cel contacten gegenereerd worden (Kowalczyk et al., 2004; Orford et al., 1999; D'Souza-Schorey et al., 2005).

Afname van AJ correleert met een afname in cel-cel contact. Verschillende eiwitten (o.a. IQGAP1) in de buurt van cel-cel contacten of activering van *adenomatous polyposis coli* (APC) kunnen E-cadherin gemedieerde cel-cel adhesie verminderen, door een binding aan te gaan met β -catenin. Hierbij wordt α -catenin afgesplitst van het E-cadherin/ β -catenin/ α -catenin complex wat leidt tot de formatie van zwakke adhesie en dus leidt tot een afname in cel-cel contact (Orford et al., 1999; Boer de, et al., 2008).

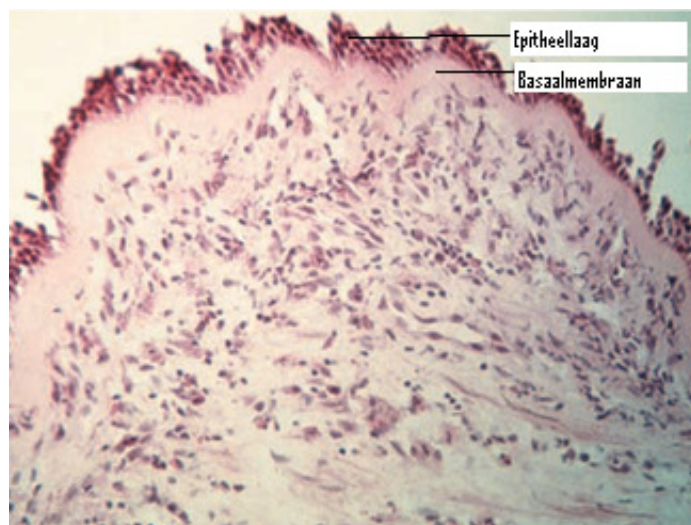
- Bronchiaal epitheel van astmapatiënten

Veranderingen in het bronchiale epitheel spelen mogelijk een rol bij het verdere verloop van het ziekteproces bij astma. Bij astmapatiënten zijn de cellen van de verschillende epitheel lagen ernstig beschadigd. In de bovenste laag, columnar laag, laten trilhaar dragende cellen gedeeltelijk of geheel los. Deze losgelaten epitheelcellen zijn in clusters gevonden in het sputum (Jeffery, 2001). Ook is er een verhoogd aantal epitheelcellen in het bronchoalveolar lavage vloeistof gevonden (Bergeron et al., 2009; Jeffery, 2001). Het verlies van de bovenste epitheel laag is ook goed in biopten te zien, zie figuur 4 (Bergeron et al., 2009; Jeffery, 2001; Longziekten).

Ook is er een verhoogd aantal Goblet cellen te zien in de columnar laag vergeleken met gezonde individuen (Holgate et al., 1999; Demedts et al., Longziekten). Het verlies van epitheel oppervlak blijkt overeen te komen met een verlies van luchtweg functie, de ernst hiervan varieert echter tussen astmapatiënten (Jeffery, 2001). Er wordt ook squameuze metaplasie waargenomen, hierbij verandert de structuur van het weefsel in een plaveiselachtige structuur. De squameuze metaplasie berust waarschijnlijk op de natuurlijke herstelmechanismen van het epitheel (Bergeron, et al., 2009).

Naast het verlies van epitheelcellen treedt er ook verdikking op van het basaal membraan, zie figuur 4. Deze verdikking wordt veroorzaakt door depositie van collageen, een verhoging in activiteit van fibroblasten en uitscheiding van groeifactoren (Bergeron, et al. 2009, Jeffery, 2001).

De onderlinge hechting van epitheelcellen, gereguleerd door adhesie en tight juncties, blijkt bij astmapatiënten verstoord te zijn. Hierdoor hebben de juncties een verminderend functionerend vermogen, wat mogelijk een rol speelt bij de toename van de fragiliteit van het epitheel (Holgate et al., 2008). Het epitheel van astmapatiënten heeft, vergeleken met gezonde individuen, minder intercellulaire adhesie (Boer de, et al., 2008; Holgate et al., 1999, 2008). Zo blijven columnar cellen wel aan elkaar zitten, maar komen los van de basale cellen (Holgate et al., 1999, 2008; Longziekten). Bij astmapatiënten is bekend dat de expressie van IL-4 en IL-3 verhoogd is wat leidt tot stimulatie van cellen betrokken bij het ontstekingsproces in astma, zie figuur 1 (Adieh et al., 2001, Barnes et al., 2008). Deze cellen, onder andere eosinofielen en mestcellen laten verschillende mediators vrij. Zo laten eosinofielen onder andere proteases vrij, die zorgen voor afbraak van adhesie en tight junctions (Sauter et al., 2008; Adieh, et al., 2001). Door de vrijgekomen proteases neemt α -catenin af waardoor een goede adhesie junction afneemt, wat leidt morfologische veranderingen van epitheelcellen (Boer de, et al., 2008). Onder normale omstandigheden draagt α -catenin bij aan het E-cadherin/ β -catenin/ α -catenin complex, zie ook figuur 3 (Förster et al., 2008). Ook de aanwezigheid van E-cadherin in het membraan daalt na blootstelling aan, door allergenen gestimuleerde uitscheiding van, proteases (Boer de et al., 2001). Een vermindering van E-cadherin leidt tot een verhoogde permeabiliteit van het epitheel en een toename in fragiliteit door afname van cel-cel contacten (Boer et al., 2001; Holgate, 2008).



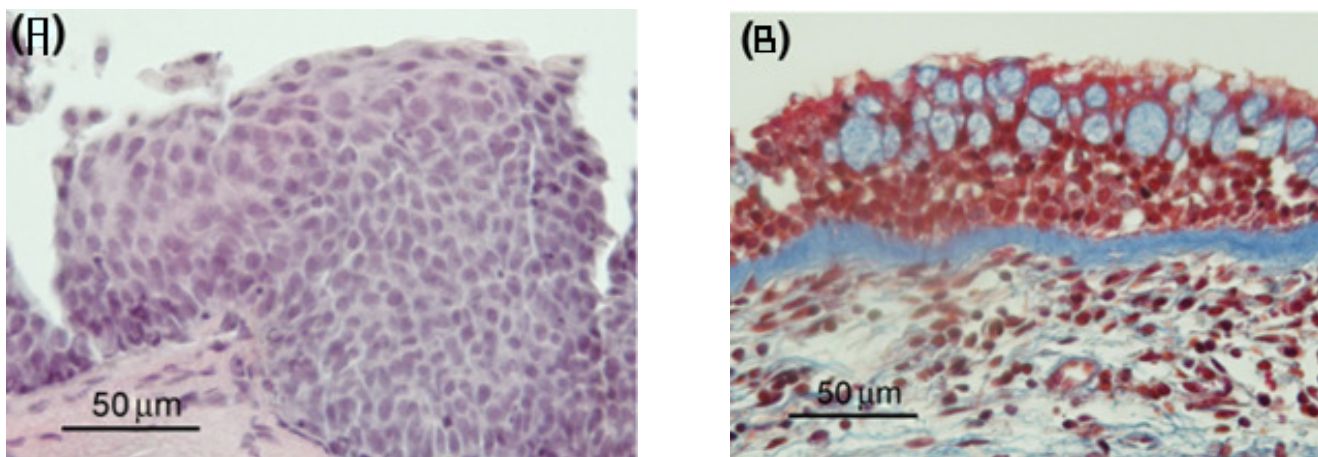
Figuur 4 Een bronchiaal biopt van een atopische astmapatiënt met behulp van licht microscopie. Duidelijk zichtbaar is een vermindering van oppervlakte epitheel en een verdikking van het basaal membraan (Jeffery et al., 2001).

- Bronchiaal epitheel roker

Naast een toename in astma klachten induceert ook sigarettenrook veranderingen in de morfologie van het bronchiaal epitheel. Door sigarettenrook neemt het aantal en het functioneren van trilhaar dragende cellen af (Thorley et al., 2007). Dit leidt tot een verminderde zuiverende werking van de luchtweg (Thorley et al., 2007). Bij chronische rokers wordt een toename van het aantal Goblet cellen (slijm producerende cellen) gezien (Lumsden et al., 1984; Saetta et al., 2000). Ook vertonen de Goblet cellen metaplasie, verandering in celstructuur (Lumsden et al., 1984).

Daarnaast is er een verhoogd aantal ontstekingscellen, onder andere neutrofielen, aanwezig in het epitheel van rokers (Saetta et al., 1994, 2000). Ontstekingscellen scheiden granules uit met daarin proteases (neutrofiel elastase) die voor verdere beschadiging zorgen (Saetta et al., 1994, 2000). Een afname in het aantal Clara cellen wordt gezien in onderste luchtwegen (Lumsden et al., 1984). Dit kan leiden tot een afname in longfunctie doordat er een verminderde surfactant uitscheiding is (Lumsden et al., 1984; Tian et al., 2009). Ook kunnen Clara cellen na blootstelling aan stikstofdioxide (NO₂), een component van sigarettenrook die voor beschadiging zorgt aan het epitheel, fungeren als progenitor stamcellen die de beschadigde epitheelcellen vervangen (Lumsden et al., 1984).

Door de schadelijke stoffen in sigarettenrook worden de tight junctions beschadigd (Gelbman et al., 2007; Thorley et al., 2007). Het eiwit occludin, betrokken bij vorming van tight junctions, wordt beïnvloed door sigarettenrook wat leidt tot veranderingen in aanhechting aan het cytoskelet (Thorley et al., 2007). Hierdoor wordt het epitheel permeabel voor indringers van buitenaf wat leidt tot activering van het immuunsysteem (Gangl et al., 2004; Hecht et al., 1994; Tian et al., 2009). Naast een afname in barrière functie wordt door sigarettenrook ook de migratie, proliferatie en differentiatie van epitheelcellen onderdrukt. Hierdoor kunnen epitheelcellen defecten, die zijn ontstaan aan het epitheel, niet goed repareren (Gangl et al., 2004).



Figuur 5. Bronchiale biopten van rokende astmapatiënten. (A) Squameuze cel metaplasie. (B) Hyperplasie van Goblet cellen en een verdikking van basaalmembraan (blauw aangekleurd) (St-Laurent et al., 2008).

- Bronchiaal epitheel van rokende astmapatiënten

In de inleiding is al kort genoemd dat rokende astmapatiënten een verergering hebben van astmaklachten ten opzichte van niet-rokende astmapatiënten. Er is echter nog weinig bekend over de effecten van roken op de morfologie van het bronchiaal epitheel bij astmapatiënten. Uit het onderzoek van Broekema et al., ongepubliceerd volgt dat er bij rokende astmapatiënten veranderingen te zien zijn in het ontstekingspatroon. Zo zijn er minder eosinofielen, maar meer mestcellen ten opzichte van niet-rokende astmapatiënten. Dit leidt ook tot veranderingen in het bronchiaal epitheel. Bij rokende astmapatiënten is een toename van epitheeldikte te zien ten opzichte van niet-rokende astmapatiënten. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een disbalans in het reparatieproces van het bronchiaal epitheel (Broekema et al., ongepubliceerd).

Er is bij rokende astmapatiënten namelijk een verhoogde proliferatie van epitheelcellen gevonden in intacte en basale bronchiale epitheelcellen (*Broekema et al., ongepubliceerd*). Een verhoogde proliferatie wordt waarschijnlijk veroorzaakt door herhaaldelijke beschadiging van het bronchiaal epitheel door sigarettenrook wat leidt tot stimulering van een ontstekingsrespons. Hierdoor beginnen epitheelcellen te prolifereren en migreren naar plaats van beschadiging (*St-Laurent et al., 2008*). Ook vindt er door proliferatie van epitheelcellen een verhoogde squameuze cel metaplasie plaats ten opzichte van niet-rokende astmapatiënten, zie figuur 5A (*St-Laurent et al., 2008*). Uit het onderzoek van *Broekema et al.*, en van *St-Laurent et al., 2008* volgt dat er bij rokende astmapatiënten een toename is in het aantal Goblet-cellen, zie figuur 5B. De toename van Goblet-cellen gaat ten kostte van het aantal trilaar dragende cellen (*Saetta et al., 1994*). Een toename in het aantal Goblet-cellen leidt tot meer slijmproductie. Dit leidt tot meer sputum uitscheiding, wat een kenmerk van rokende astmapatiënten is (*Broekema et al., ongepubliceerd*).

De rol van Wnt/ β -catenin pathway in bronchiaal epitheel

In het vorige hoofdstuk is beschreven hoe de morfologie van het bronchiaal epitheel eruit ziet in normale omstandigheden en hoe de morfologie verandert in astmapatiënten, rokers en rokende astmapatiënten. Nu wordt er gekeken naar de mogelijke rol die het Wnt/ β -catenin pathway speelt bij de ontstane morfologische veranderingen in astmapatiënten en rokers. Eerst wordt echter gekeken naar de rol van het Wnt/ β -catenin pathway in normale omstandigheden.

- Gezond bronchiaal epitheel

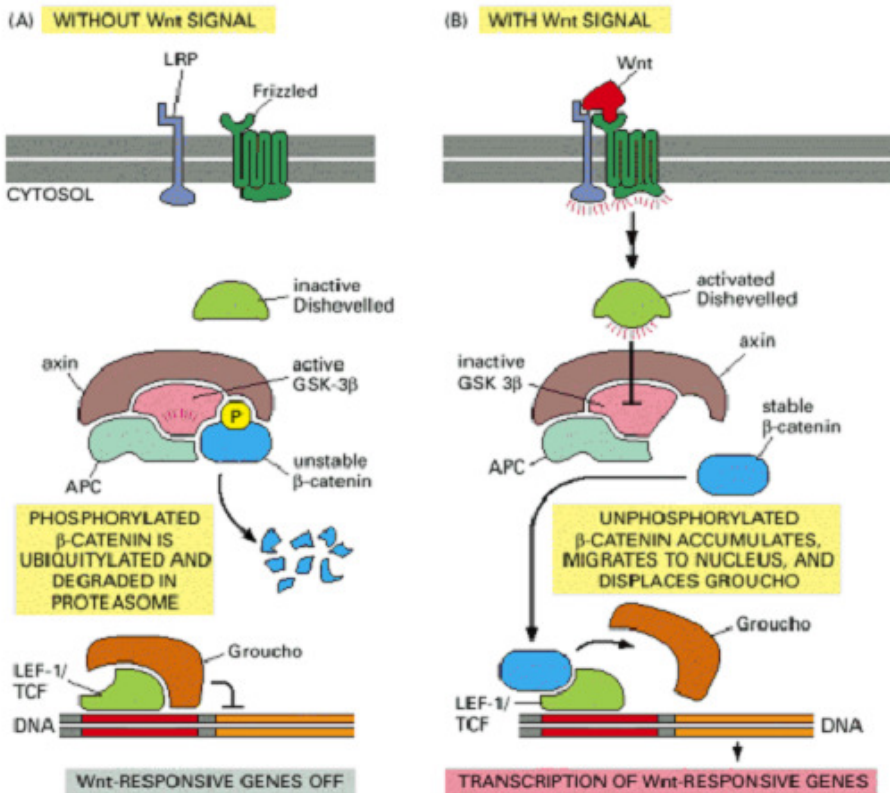
Tijdens de ontwikkeling van de long is epitheelcel differentiatie erg belangrijk voor een succesvol functionerende long (Pringle et al., 1986, Spooner et al., 1970). De ontwikkeling van de long, proliferatie, specialisatie, en cel-cel interacties, wordt gereguleerd door onder andere de Wingless signalering (Wnt) – pathway. Wnt-eiwitten zijn uitgescheiden signaleringsmoleculen die als lokale mediators verschillende aspecten tijdens de ontwikkeling van de long reguleren (The Cell, 4th edition). Ook kunnen Wnt-eiwitten fungeren als *morphogens*; eiwitten fungeren dan als signaalmoleculen die verschillende ervoor zorgen dat cellen in een bepaald patroon komen te liggen (Pringle et al., 1986; Spooner et al., 1970; The Cell, 4th edition). De Wnt-eiwitten kunnen ten minste drie verschillende intracellulaire signalerings pathways activeren: de canonical Wnt/ β -catenin pathway, de non-canonical pathway en de Wnt-Ca²⁺ pathway. Door de canonical Wnt/ β -catenin pathway wordt β -catenin activiteit gereguleerd, zie Figuur 6 (Scoyk et al., 2008).

De Wnt-signalering via de canonical en de non-canonical pathway wordt in gang gezet door binding van Wnt-eiwitten aan Frizzled (Fzd) transmembraan receptoren. Fzds binden verschillende Wnt-liganden, ook Wnt afhankelijke liganden kunnen aan Fzd binden en zo de Wnt-pathway beïnvloeden. De formatie van een Fzds/Wnt complex zorgt met behulp van G-eiwitten voor activering van de pathway (Scoyk et al., 2008).

Een belangrijke component in de Wnt-signalerings pathway is β -catenin (Orford et al., 1999). β -Catenin behoort tot de adhesie junctie eiwitten die samen met E-cadherin en α -catenin een belangrijke rol speelt in cel-cel adhesie (Orford et al., 1999). β -Catenin kan na activering van het Wnt-signalering pathway zorgen voor stimulering van de transcriptie van Wnt-genen (Scoyk et al., 2008; Orford et al., 1999). Activering van Wnt-genen kan gebeuren na beschadiging van luchtweegepitheel. Zo zijn Wnt-genen betrokken bij reparatie processen na beschadiging van het luchtweegepitheel (Orford et al., 1999). Dus naast zijn rol bij cel-cel adhesie heeft β -catenin een regulerende functie en speelt het een rol bij het in stand houden van de integriteit van het epitheel (Orford et al., 1999).

In afwezigheid van een Wnt-signaal, dus in de ongestimuleerde canonical pathway is het grootste deel van β -catenin gelokaliseerd bij cel-cel adhesie juncties, in het cytosol, waar het gekoppeld is aan E-cadherin. In de ongestimuleerde canonical pathway vindt er dus geen formatie van een Wnt/Fzd complex plaats en wordt β -catenin gefosforyleerd door glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) dat een complex vormt met adenomatoos polyposis coli (APC) en axin. GSK-3 is een eiwit dat tot expressie wordt gebracht door het gen GSK-3 β . Dit gen codeert voor een multifunctioneel eiwit kinase wat fungeert als een negatieve regulator van de Wnt/ β -catenin signalering pathway wat dus verantwoordelijk is voor de fosforylatie van β -catenin, zie figuur 6A (Tian et al. 2009). De fosforylatie van β -catenin door GSK-3 zet aan tot degradatie, resulterend in een afname van β -catenin in het cytoplasma, zie figuur 6A. Doordat β -catenin wordt afgebroken en dus niet naar de nucleus wordt getransporteerd blijven de Wnt-genen inactief (Hlsken et al., 2000).

In het geval van de gestimuleerde canonical pathway bindt een Wnt-ligand aan Fzds. Door deze binding wordt Dishevelled, een eiwit in het Wnt-signalering pathway, geactiveerd resulterend in de inhibitie van het GSK-3/APC/axin-complex, zie Figuur 6B. Als gevolg hiervan wordt β -catenin niet gefosforyleerd en dus ook niet gedegradeerd wat leidt tot accumulatie van β -catenin in het cytoplasma. De geaccumuleerde β -catenin wordt naar de nucleus getransporteerd waar het aangrijpt op TCF en lymfoid enhancer factor (LEF) wat ervoor zorgt dat de corepressor Groucho loslaat waarna vervolgens de transcriptie van een aantal target Wnt-genen wordt aangezet (Scoyk et al., 2008; Hlsken et al., 2000).



Figuur 6. Schematische weergave van de Wnt/ β -catenin signaal transductie route.

(A) In de afwezigheid van een Wnt-signaal wordt een deel van β -catenin wat gebonden is aan cadherin eiwitten en een deel van het β -catenin uit het cytoplasma gebonden aan het GSK-3/APC/Axin complex (niet zichtbaar in Figuur 6). In dit complex wordt β -catenin gefosforyleerd door GSK-3, wat resulteert in stimulering van ubiquitin-gemedieerde degradatie in proteasomen. Wnt-genen blijven inactief door de binding van Groucho co-repressor proteïne aan TCF/LEF gen regulator proteïne.

(B) Wanneer een Wnt-eiwit bindt aan een Frizzled receptor wordt Dishevelled geactiveerd, waardoor GSK-3 in het GSK-3/APC/Axin complex wordt geïnhibieerd. Het gevolg hiervan is dat de fosforylatie en degradatie van β -catenin wordt onderdrukt, wat leidt tot accumulatie in het cytoplasma en in de nucleus. In de nucleus bindt het aan TCF/LEF waardoor Groucho loslaat en fungeert als een co-activator van de stimulering van de transcriptie van Wnt-genen (The Cell, 4th edition; Fig.15-72)

Uit onderzoek is gebleken dat β -catenin mogelijk betrokken is bij het ontstaan van kanker (Pulling et al., 2001). Aangetoond is dat overexpressie van β -catenin, veroorzaakt door bijvoorbeeld mutaties in: Wnt/Fzd-signalering, APC of β -catenin genen, leidt tot nucleaire accumulatie van β -catenin en stimulering van transcriptie van Wnt-genen (Pulling et al., 2001; Orford et al., 1999). Dit kan leiden tot verhoogde proliferatie van epitheelcellen en inhibtie van apoptose (Pulling et al., 2001). Verhoogde proliferatie zorgt voor fenotypische veranderingen aan het epitheel, zo verandert de morfologie van de epitheelcellen waarbij ze een meer langgerekt en spindle shaped vorm krijgen.

- De invloed van Wnt/ β -catenin op het bronchiaal epitheel van astmapatiënten

Van astma is al kort beschreven, in de inleiding, hoe het ziekteproces tot stand komt en hoe het zich verder ontwikkelt. Vervolgens is beschreven wat voor invloed dit heeft op de morfologie van het bronchiaal epitheel. De vraag is welk mechanisme een rol speelt bij deze morfologische veranderingen. In normale omstandigheden draagt α -catenin bij aan de regulering van het adhesie junctie complex architectuur. Bij astmapatiënten neemt de werking van α -catenin af, waardoor de adhesie juncties verbroken worden (Sauter et al., 2008; Adieh et al., 2001; Boer de, et al., 2001). Ook de aanwezigheid van E-cadherin in het epitheel neemt ook af door gestimuleerde proteases (Boer de et al., 2001). Masuyama et al., 2003 lieten zien dat er een verhoogde concentratie oplosbare E-cadherin in het sputum van astmapatiënten aanwezig is. Dit impliceert dat een afname van α -catenin en E-cadherin leidt tot een afbraak in de verbinding tussen E-cadherin/ α -catenin met β -catenin.

Een verminderde binding leidt tot een toename van β -catenin concentratie in het cytoplasma, dit leidt tot accumulatie van β -catenin in de nucleus waar het TCF en LEF activeert waardoor de transcriptie van Wnt-genen wordt aangezet, hiermee de proliferatie van epitheelcellen inducerend (Scoyk et al., 2008; Boer de, et al., 2001). Naast een verandering in adhesie en tight juncties veroorzaakt door ontstekingscellen, waardoor de verbinding tussen E-cadherin/ α -catenin/ β -catenin verbroken wordt is er een andere theorie die de rol van Wnt/ β -catenin bij astmapatiënten onderbouwt. Deze theorie komt uit de studie van Syed et al., 2007. In dit onderzoek hebben ze een significant up-regulatie van Wnt-5a in het bloed van astmapatiënten gevonden (Syed et al., 2007; Scoyk et al., 2008). Wnt-5a is één van de vele Wnt eiwitten/liganden die kan binden aan Fzd en een Wnt/Fzd complex vormt (Scoyk et al., 2008). Gedacht wordt dat Wnt-5a is up-gereguleerd in astmapatiënten waardoor het GSK-3/APC/axin- complex wordt geïnhibeerd (Scoyk et al., 2008; Syed et al., 2007). Hierdoor kan β -catenin niet meer worden gefosforyleerd en dus ook niet worden gedegradeerd, wat tot accumulatie in de nucleus leidt (Scoyk et al., 2008). Zoals al eerder is beschreven heeft β -catenin in de nucleus een stimulerende functie op de activering van transcriptie van Wnt-genen (Orford et al., 1999; Scoyk et al., 2008). Dit leidt tot activering van Wnt-genen welke een belangrijke rol spelen in de groei, proliferatie en differentiatie van cellen. Mogelijk is de stimulering van proliferatie van epitheelcellen een verklaring voor de vorming van epitheelcel hyperplasie in astmapatiënten (Bergeron et al., 2009).

- De mogelijke rol van Wnt/ β -catenin in het bronchiaal epitheel van een roker

Zoals al eerder genoemd is GSK-3 β een multifunctioneel eiwit kinase wat fungeert als een negatieve regulator van de Wnt/beta-catenin signalering pathway door de fosforylatie en daarmee afbraak van β -catenin. In geval van activering van Wnt/ β -catenin pathway bindt het Wnt-ligand aan Fzds dit resulteert in de inhibitie van het GSK-3/APC/axin- complex (Tian et al., 2009; Hlsken et al., 2000).

Het is beschreven dat sigarettenrook de Wnt-pathway activeert. Dit leidt tot ligand binding aan Fzd, waarbij een Wnt/Fzd complex wordt gevormd, zie ook figuur 6B (Scoyk et al 2008). Door deze binding wordt Dishevelled geactiveerd die er vervolgens voor zorgt dat GSK-3 β wordt geïnhibeerd, zie figuur 6B (Tian et al., 2009; The Cell, 4th edition). Ook zorgt sigarettenrook voor een toename in fosforylatie van GSK-3, de inactieve vorm van GSK-3 (Tian et al., 2009). Als gevolg hiervan wordt de fosforylatie en degradatie van β -catenin onderdrukt. Dit suggereert dat GSK-3 expressie een mogelijke rol speelt in alveolaire beschadigingen veroorzaakt door sigarettenrook, aangezien GSK-3 β verhoogd tot expressie kwam in gekweekte alveolaire cellen van Tian et al., 2009.

Chen et al., 2001 hebben gekeken naar de mogelijke rol die β -catenin speelt bij beschadiging en reparatie ten gevolge van roken. In dit onderzoek hebben ze de expressie van β -catenin bepaald met behulp van een immunocytochemische kleuring (Chen et al., 2001). Hieruit volgt dat de expressie van β -catenin in het membraan verminderd is bij rokers ten opzichte van niet-rokers, maar in het cytoplasma leidt tot een verhoging van β -catenin expressie (Chen et al., 2001; Tian et al. 2009).

Hieruit kan dus worden opgemerkt dat sigarettenrook leidt tot een toename van niet-gefosforyleerde β -catenin, waardoor het accumuleert in de nucleus en de transcriptie van Wnt-genen stimuleert (Tian et al., 2009; Scoyk et al., 2008).

Ook kan sigarettenrook mutaties genereren, in onder andere APC-genen, die een rol spelen bij het ontstaan van kanker. Dit leidt tot een toename in Wnt-signalering wat gebeurt bij. Zo is een progressieve toename van β -catenin eiwit expressie gevonden in met tabaksgerelateerde alkaloïde (NNK) behandelde BEP2D cellen (epitheelcellijn) en in longtumor cellijnen (Zhou et al., 2003). Dit suggereert dat β -catenin een belangrijke rol speelt in de initiatie en progressie van NNK-geïnduceerde 'malignant' (ongecontroleerd groeiend) transformerende bronchiale epitheelcellen in mensen (Zhou et al., 2003).

- Invloed van roken op het Wnt/ β -catenin pathway bij astmapatiënten

In het hoofdstuk over de morfologie van bronchiaal epitheel is beschreven dat de morfologie van het bronchiaalepitheel bij astmapatiënten verandert wanneer deze patiënten gaan roken. Hierdoor verergerd het ziekteproces van rokende astmapatiënten, verergering van astmaklachten, ten opzichte van niet-rokende astmapatiënten, zie ook de Inleiding (*St-Laurent et al., 2008; Broekema et al., ongepubliceerd*).

Via welk mechanisme deze veranderingen in het epitheel bij rokende astmapatiënten worden geïnduceerd is nog niet bekend. Wel bekend is dat het Wnt/ β -catenin signaleringspathway een belangrijke rol speelt in het epitheel (*Scoyk et al., 2008*). In het epitheel is het Wnt- signaleringspathway betrokken bij cel-cel adhesie en bij de regulering van Wnt-genen (*Scoyk et al., 2008*).

Het pathway wordt beïnvloed door het ziekteproces van astma en roken (zie het vorige hoofdstuk) (*Scoyk et al., 2008; Tian et al., 2009; Steel et al., 2005*). Hierdoor treedt er een verandering op in de expressie van Wnt-genen wat mogelijk een rol speelt bij het verloop van het ziekteproces.

Men heeft zich echter nog afzijdig gehouden van onderzoek naar de invloed van roken op het Wnt/ β -catenin pathway bij astmapatiënten. Het is interessant om te onderzoeken wat het effect zou zijn van roken op het Wnt/ β -catenin pathway in astmapatiënten. Een nieuw onderzoek zou opgezet moeten worden waarbij gekeken zou worden naar de verschillen tussen gezonde individuen, astmapatiënten, gezonde rokers en rokende- astmapatiënten.

Een mogelijk opzet zou zijn om bipten te nemen van individuen uit de verschillende groepen. Deze bipten zouden vervolgens met behulp van immunohistochemie aangekleurd kunnen worden. Gedacht zou kunnen worden aan een kleuring waarbij niet-gefosforyleerde β -catenin en gefosforyleerde β -catenin aangekleurd worden in het cytoplasma. Bij gezonde individuen zou gefosforyleerde β -catenin aangekleurd worden, echter deze wordt gedegradeerd in het cytoplasma. Er zal dus een relatief lage concentratie gefosforyleerde β -catenin zichtbaar worden in het cytoplasma. Bij niet-rokende astmapatiënten wordt een lagere concentratie gefosforyleerde β -catenin verwacht in het cytoplasma ten opzichte van gezonde individuen. Echter, er zou een hoge concentratie niet-gefosforyleerde β -catenin gezien kunnen worden in het cytoplasma, omdat β -catenin niet wordt gefosforyleerd door GSK3/APC/axin complex, doordat er een up-regulatie van Wnt5a is die het complex inhibeert. Ook bij gezonde rokers wordt een hoge concentratie niet-gefosforyleerde β -catenin in het cytoplasma verwacht. Sigarettenrook induceert activering van het Wnt/Fzd complex, wat vervolgens ook leidt tot inhibitie van het GSK3/APC/axin complex. Het is echter moeilijk om met behulp van immunohistochemie uitspraken te doen over de hoeveelheid van een bepaald eiwit, in dit geval β -catenin, in het cytoplasma. Ook is het de vraag of er een duidelijk onderscheid te zien is tussen gefosforyleerde en niet-gefosforyleerde β -catenin.

Een andere mogelijkheid is kijken naar de aanwezigheid van niet-gefosforyleerde β -catenin in de nucleus. Van niet-gefosforyleerde β -catenin is bekend dat het actief is in de nucleus, wanneer het Wnt/ β -catenin geactiveerd is in bijvoorbeeld astmapatiënten en rokers. Dus kleuring van niet-gefosforyleerde β -catenin in de nucleus zal bij astmapatiënten en rokers verhoogd zijn ten opzichte van gezonde individuen.

Wanneer de resultaten van astma studies en rokers studies gecombineerd worden dan zou verwacht kunnen worden dat het GSK/APC/axin nog sterker wordt geïnhibeerd, wat ervoor zou zorgen dat β -catenin niet wordt gefosforyleerd. In het cytoplasma zou dus géén gefosforyleerde β -catenin zichtbaar zijn, maar wel een relatief hoge concentratie niet-gefosforyleerde β -catenin. Dit zou dan kunnen leiden tot een accumulatie van β -catenin in de nucleus. Met behulp van een kleuring van niet-gefosforyleerde β -catenin in de nucleus zou bepaald kunnen worden of de concentratie niet-gefosforyleerde β -catenin verschilt in astmapatiënten, rokers en niet-rokende astmapatiënten.

Op deze manier zou er een verklaring kunnen worden gevonden in de ontstane veranderingen in morfologie tussen de groepen. Wanneer er géén veranderingen zijn tussen rokende astmapatiënten en de niet-rokende astmapatiënten zou er naar een ander mechanisme gekeken moeten worden.

- Conclusie

Uit deze scriptie kan worden geconcludeerd dat Wnt/ β -catenin een rol speelt bij de morfologische veranderingen in het bronchiaal epitheel bij astmapatiënten en rokers. Vermoed wordt dat het ook een rol speelt bij rokende astmapatiënten. Echter, er is nog veel onbekend er moet dus nog veel onderzoek gedaan worden naar de rol en invloed van het Wnt/ β -catenin pathway op het bronchiaal epitheel.

Kennis over de werking van dit mechanisme in verschillende aandoening kan leiden tot een mogelijke behandeling, het tegengaan van remodelering, bij astmapatiënten, rokers en rokende astmapatiënten.

Zo zou een mogelijke behandeling bij astmapatiënten en rokers gericht kunnen zijn tegen de accumulatie van niet-gefosforyleerde β -catenin in de nucleus. Wanneer accumulatie in de nucleus wordt tegen gewerkt leidt dat tot een verminderde transcriptie van Wnt-genen. Door een verminderde transcriptie is er een verminderde proliferatie en differentiatie van epitheelcellen. Hierdoor kunnen morfologische veranderingen in het bronchiaal epitheel worden voorkomen. Uiteindelijk zou dit dus kunnen leiden tot een vermindering van symptomen en klachten.

Referenties

- Adieh M, Vandenbos T, Youakim A. Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 2001; 281:2029-2038
- Althuis MD, Sexton M, Prybylski D. Cigarette smoking and asthma symptom severity among adult asthmatics. *Journal of Asthma.* 1999; 36(3): 257-264
- Astmafonds: www.astmafonds.nl
- Atkinson J, Adair-Kirk TL, Kelley DG, deMello D, Senior RM. Clara cell adhesion and migration to extracellular matrix. *Respiratory Research* 2008; Vol. 9
- Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature reviews Immunology* vol. 8, 2008
- Bergeron C, Al-Ramli W, Hamid Q. Remodeling in asthma. *Proc Am Thora Soc.* 2009; 6: 301-305
- Boer de WI, Sharma HS, Baelemans SMI, Hoogsteden HC, Lambrecht BN, Braunstahl GJ. Altered expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: possible role in inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2008; 86: 105-112
- Broekema M. et al., ongepubliceerd werk
- Chaudhuri R, Livingstone E, McMhahon AD, et al. Effects of smoking cessation on lung function and airway inflammation in smokers with asthma. 2006; 174: 127-133
- Chen F, Wu R, Wang X. Effects of cigarette smoke extract on the expression of beta-catenin and tyrosine phosphorylation in airway epithelial cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2001; 81: 406-410
- D'Souza-Schorey C. Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. *Trends Cell Biol.* 2005 Jan; 15(1):19-26
- Eisner MD, Yelin EH, Trupin L, Blanc PD. Asthma and smoking status in a population-based study of California adults. *Public Health Rep.* 2001; 116: 148-157
- Förster C. 2008. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol.* Vol. 130: 55-70
- Gangl, Reininger et al., Cigarette smoke facilitates allergen penetration across respiratory epithelium; *Allergy* 2009; 64: p.398-405
- Gelbmani BD, Heguy A, O'Connor TP, Zabner J, Crystal RG. Up regulation of pirin expression by chronic cigarette smoking is associated with bronchial epithelial cell apoptosis. *Respiratory Research* 2007; 8: 1-13
- Hecht SS, Carmella SG, Foiles PG, Murphy SE. Biomarkers for human uptake and metabolic activation of tobacco-specific nitrosamines. *Cancer Res* 1994;54: 1912-17
- Hlsken J and Behrens J. The Wnt-signaling pathway. *J. Cell Sci.* 2000; 113: p.3545-3546

- Holgate ST, Lackie PM, Davies DE, Roche WR, Walls AF. The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodeling in asthma. *Clin Exp Allergy* 1999;29:90–95
- Holgate ST. Pathogenesis of Asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2008; 38: 872-897
- Jeffery, P.K. 2001. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: S28–S38
- Jong de PM, Dijkman, JH, Ponc M. The bronchial epithelium: Fundamental aspects of structure and function. Proefschrift van P.M. de Jong (The role of bronchial epithelial cells in allergic asthma, 1994)
- Kowalczyk AP, Reynolds AB. Protecting your tail: regulation of cadherin degradation by p120-catenin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004 Oct, 16(5):522-7
- Longziekten. Demedts M, Dijkman JH, Hilvering C, Postma DS; p. 630-639
- Lumsden AB, McLean A, Lamb D. Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. *Thorax* 1984; 39:844-849
- Masuyama K, Morishima Y, Ishii Y, Nomura A, Sakamoto T, Kimura T et al. Sputum E-cadherin and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* 2003 Jul; 112(1): 208-9
- Molecular biology of The Cell. 4th edition; Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P; 2002
- Orford K, Orford CC, Byers SW. Exogenous expression of beta-catenin regulators contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest. *The journal of Cell Biology.* 1999; 146; 4: p.855-867
- Pringle KC. Human fetal lung development and related animal models. *Clin. Obst. Gynecol.* 1986; 29:502-13
- Pulling LC, Klinge DM, Belinsky SA. p16^{INK4alpha} and Beta-catenin alterations in rat liver tumors induced by NNK 2001; 22: 461-466
- RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Mileu) ; www.rivm.nl/vt/object_document/o1209n19085.html
- Saetta M, Finkelstein R, Cosio M.G. Morphological and cellular basis for airflow limitation in smokers. *Eur Rspir J*, 1994, 7, 1506-1515
- Saetta M, Turato G, Beraldo S, Zanin A, Braccioni F, Mapp CE, Maestrelli P, Cavallesco , Papi A, Fabbri LM. Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1016-1021
- Sauter A, Stern-Straeter J, Chang RC, Hörmann K, Naim R. Influence of interleukin-13 on beta-catenin levels in eosinophilic chronic rhinosinusitis cell culture. *Int. J of molecular medicine.* 2008, 21: 447-452
- Scoyk M, Randall J, Sergew A, Williams LM et al. *Translational Research.* 2008; 151; 4: p. 175-180
- Siroux V, Pin I, Oryszczyn MP, Moual Le N, Kauffmann F. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. *Eur Respir J* 2000; 15: 470-477

- Spooner BS, Wessels NK. Mammalian lung development: interactions in primordium formation and bronchial morphogenesis. *J. Exp. Zool.* 1970; 175:445-54
- Steel MD, Puddicombe SM, Hamilton LM, Powel RM, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE, Collins JE. Beta-catenin/ T-cell factor mediated transcription is modulated by cell density in human bronchial epithelial cells. *Int J of Biochemistry & Cell Biology.* 2005; 31: 1281-1295
- St-Laurent, Bergeron C, Pagé N, Couture C, Laviolette M, Boulet LP. Influence of Smoking on airway inflammation on remodeling in asthma. *Clinical and Experimental Allergy.*, 2008, 38, 1582-1589
- Syed F, Huang CC, Li K et al. Identification of interleukin-13 related biomarkers using peripheral blood mononuclear cells. *Biomarkers* 2007; 12: 414-423
- Tian D, Zhu M, Li J, Ma Y, Wu R. Cigarette smoke extract induces activation of beta-catenin/ TCF signaling through inhibiting GSK3beta in human alveolar epithelial cell line 2009; 187: 58-62
- Thorley AJ, Tetley TD. Pulmonary epithelium, cigarette smoke, and chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of COPD.* 2007; 2: 409-428
- Zhou H, Calaf GM, Hei TK. Malignant transformation of human BEC with the tobacco-specific nitrosamine, NNK 2003; 106: 821-826