

Fenotypeplasticiteit en astma

Een dubbelleven voor de luchtweg gladde spiercel

Bachelorscriptie
Auteur: Marieke van Ziel
Begeleider: Reinoud Gosens
Department of Molecular Pharmacology
September 2010

Inhoudsopgave

Introductie	3
Astma: een chronische luchtwegaandoening.....	3
Het fenomeen van de fenotypeplasticiteit.....	3
Wetenschappelijk en maatschappelijk belang.....	4
Deze scriptie.....	4
Hoofdstuk 1:	
Micro-omgeving en inductie van fenotypeverandering	5
Maturatie: insuline en laminine.....	5
Maturatie: TGF- β	6
Modulatie.....	6
Modulatie: fibronectine en TNF- α	6
Modulatie: collageen I.....	7
Modulatie: PDGF.....	7
Fenotypemarkers.....	8
Hoofdstuk 2:	
Intracellulaire signaaltransductieroutes bij fenotypeverandering	10
Maturatie: Rho-kinase signaaltransductieroute.....	10
Maturatie: PI 3-kinase signaaltransductieroute.....	11
Maturatie: insuline en laminine.....	11
Maturatie: TGF- β en de Smad route.....	11
Maturatie: een overzicht.....	12
Modulatie: PDGF en SRF.....	12
Modulatie: collageen I en fibronectine.....	13
Modulatie: TNF- α en fibronectine.....	14
Modulatie: een overzicht.....	14
Hoofdstuk 3:	
De consequenties van fenotypeplasticiteit	15
Consequenties van fenotypeplasticiteit: de luchtweg gladde spiercel.....	15
Consequenties van fenotypeplasticiteit: de pathogenese van astma.....	15
Conclusie	18
Referenties	19

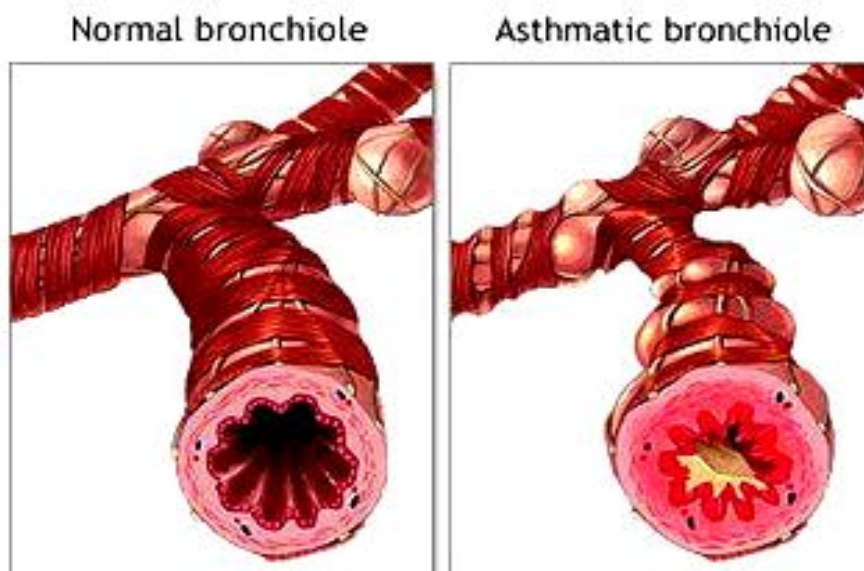
Introductie

Astma: een chronische luchtwegaandoening

Astma is een chronische ontsteking van de luchtwegen en is bij ongeveer een half miljoen Nederlanders gediagnosticeerd [1]. Naast de ontstekingsreactie wordt astma gekarakteriseerd door een overgevoeligheid van de luchtwegen voor specifieke (bijv. histamine) en non-specifieke (bijv. ingeademde koude lucht) contractiele stimuli, wat gepaard gaat met structurele veranderingen van de luchtwegwand [2]. Al deze karakteristieken zorgen direct of indirect voor luchtwegvernauwing, dat leidt tot een reductie van de luchtstroom door de longen [3-5]. De belangrijkste schakel tussen deze karakteristieken is de luchtweg gladde spiercel. Niet alleen is deze cel verantwoordelijk voor acute bronchoconstrictie, ook speelt deze cel een rol bij de regulatie van de ontstekingsreactie (door secretie van ontstekingsmediatoren), luchtweghyperreactiviteit (door een verhoogde gevoeligheid voor contractiele stimuli) en de structurele veranderingen in de luchtwegwand (door proliferatie) [3,5]. Dit maakt de luchtweg gladde spiercel een hoofdrolspeler in de pathogenese van astma.

De structurele veranderingen zorgen ervoor dat de wanden van de luchtwegen van een astmapatiënt sterk verdikt zijn. De gladde spiermassa van de luchtwegwand neemt toe en extracellulaire matrixeiwitten hopen op onder de epitheellaag. De toename van de gladde spiermassa kan verklaard worden doordat er meer cellen komen (hyperplasie) en door het ontstaan van grotere cellen (hypertrofie). Naast deze toename in gladde spiermassa is ook het basaalmembraan verdikt, is er een overmatige slijmproductie en een betere doorbloeding van de luchtwegwand. Al deze structurele veranderingen samen worden ook wel luchtwegremodeling genoemd (figuur 1) [3,6,7].

De hyperreactiviteit van de luchtwegen kent twee vormen; acute (variabele) hyperreactiviteit en chronische (persistente) hyperreactiviteit. De acute vorm is een omkeerbaar proces en is geassocieerd met periodes van verhoogde luchtwegontsteking. Chronische (persistente) hyperreactiviteit is een onomkeerbaar proces en is gerelateerd aan luchtwegremodeling [8].



Figuur 1:
Schematische doorsnede van normale luchtwegen en structureel veranderde luchtwegen bij astma

Bij astma is er een verhoogde slijmproductie en is de gladde spiermassa rond de luchtwegen toegenomen. Verder is er ook sprake van fibrose en is de doorbloeding van de luchtweg vergroot [9].

Het fenomeen van de fenotypeplasticiteit

Zoals hierboven beschreven speelt de gladde spiercel een regulatoire rol bij luchtwegontsteking, hyperreactiviteit en luchtwegremodeling [3,7]. Hoe kan het verklaard worden dat dit ene celtype bij zoveel uiteenlopende processen een belangrijke schakel is?

Waarschijnlijk is dit mogelijk doordat de gladde spiercel het vermogen heeft om van fenotype te veranderen. Deze fenotypeplasticiteit geeft de gedifferentieerde gladde spiercel de mogelijkheid om van een (hyper)contractiel fenotype naar een proliferatief/synthetisch fenotype over te schakelen en vice versa.

Dit 'switchen' tussen fenotypes gaat gepaard met fenotypespecifieke genexpressie en de expressie van de daarbij behorende eiwitten. Hierdoor ontwikkelen beide fenotypes hun eigen karakteristieke eigenschappen [10]. Bij een contractiel fenotype ligt de nadruk op luchtwegvernauwing en komen er vooral contractiele eiwitten tot expressie zoals actine en myosine. Het proliferatieve/synthetische fenotype kent eigenlijk twee functies, het vermeerderen van de gladde spiermassa door celdeling en het uitscheiden van verscheidene stoffen waaronder extracellulaire matrixeiwitten en cytokines [5,7]. Daarbij komt dat het proliferatieve/synthetische fenotype minder sterk reageert op contractiele agonisten en ook minder contractiele eiwitexpressie vertoont. Wel worden hier andere eiwitten meer tot expressie gebracht zoals onder andere *l*-caldesmon en vimentine (tabel 2) [5]. De karakteristieke eigenschappen van de twee fenotypes geven aan waar het accent ligt van de cellulaire activiteit in vergelijking met het andere fenotype, dit betekent niet dat genoemde activiteiten uitsluitend in één fenotype worden uitgevoerd.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang

De luchtweg gladde spiercel blijkt veel meer te zijn dan alleen een cel die kan contraheren. De functionele plasticiteit van deze cellen komt met name door de fenotypeplasticiteit; het kunnen wisselen van fenotype. Dit intrigerende fenomeen is dus van groot belang bij het begrip van de pathogenese van astma. Toch is hier lang niet alles over bekend en zijn nog niet alle relevante intracellulaire routes en regulatoire mechanismen achterhaald. Onderzoek hiernaar is in volle gang en kan leiden tot de ontdekking van nieuwe aangrijpingspunten voor de ontwikkeling van therapeutische strategieën bij astma. Aangezien op dit moment vooral medicatie op de markt is die de korte termijn symptomen van astma aanpakt, is het van belang dat er ook medicatie komt die de chronische veranderingen in de luchtwegen tegengaat.

Deze scriptie

In deze scriptie staat het fenomeen van fenotypeplasticiteit van de luchtweg gladde spiercel centraal. Er wordt besproken welke stoffen fenotypeverandering kunnen induceren, welke micro-omgeving belangrijk is voor het contractiele fenotype en welke voor het proliferatieve/synthetische fenotype. Daarnaast is er ook aandacht voor de opvallendste kenmerken van de verschillende fenotypes, met name met betrekking tot het fenotype-specifieke expressiepatroon van eiwitten. De belangrijkste van deze fenotypekenmerkende moleculen kunnen als markers worden gebruikt voor de identificatie van een fenotype.

Een prominente plaats in deze scriptie zal worden ingenomen door de diverse intracellulaire signaaltransductieroutes die belangrijk zijn bij verandering van het contractiele fenotype in het proliferatieve/synthetische fenotype en vice versa. Hierbij is het lastig om de signaaltransductieroutes die het ene fenotype bevorderen geheel los te zien van de signaaltransductie die het andere fenotype bevorderen. Het is een geïntegreerd systeem van intracellulaire signaaltransductie, transcriptiefactoren en genexpressie. Toch zal er een poging worden gedaan om een aantal kenmerkende routes overzichtelijk weer te geven.

Tevens zullen in het kort de belangrijkste consequenties van fenotypeplasticiteit aan bod komen. Wat betekent fenotypeverandering voor de luchtweg gladde spiercel en wat zijn de gevolgen voor de genexpressie van de cel? Ook kan er nog breder gekeken worden naar de rol van fenotypeplasticiteit bij de pathogenese van astma.

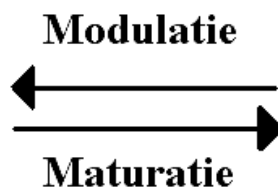
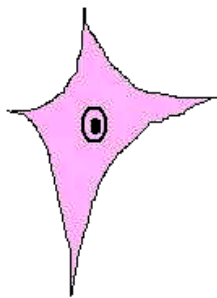
Hoofdstuk 1:

Micro-omgeving en inductie van fenotypeverandering

In de jaren zestig werden er al eerste vraagtekens gezet bij de ware aard van de (arteriële) gladde spiercel, maar pas in de jaren tachtig kwamen de onderzoeken naar fenotypeverandering van gladde spiercellen echt op gang. Het concept fenotypeplasticiteit is als eerste ontdekt in onderzoeken naar de pathogenese van atherosclerose. In 1989 werden er als eerste onderzoeken gedaan op menselijke gladde spiercellen uit de luchtwegen. Hierbij werd gekeken naar hoe de cellen reageerden op verschillende fysiologische agonisten. Pas in 1996 werd er een eerste systematische beschrijving gegeven van het reversibel wisselen van fenotype van de luchtweg gladde spiercellen [11]. In dit hoofdstuk zal eerst ingegaan worden op de verschillende stoffen die fenotypeverandering kunnen induceren. Vervolgens zal er een overzicht gegeven worden van de reeds bekende markers.

Het veranderen van fenotype verloopt via modulatie of maturatie. Bij het modulatieproces zal een contractiel fenotype veranderen in een proliferatief/synthetisch fenotype. Het proces waarbij een proliferatief/synthetisch naar een contractiel fenotype verandert heet maturatie (figuur 2). Deze processen kunnen door verscheidene eiwitten geïnduceerd worden. Vooral groeifactoren en extracellulaire matrixeiwitten kunnen fenotypeverandering teweeg brengen door de inductie van unieke intracellulaire signaaltransductieroutes [3,7,10-12]. De micro-omgeving van de gladde spiercellen is hier dus van groot belang. In tabel 1 is een overzicht weergegeven van een aantal verschillende eiwitten die maturatie of modulatie kunnen beïnvloeden. In de paragrafen hieronder zullen deze besproken worden.

Proliferatief/synthetisch fenotype



Contractiele fenotype



Figuur 2: Modulatie en maturatie

Het proces waarbij een gladde spiercel van het proliferatief/synthetisch fenotype naar het contractiele fenotype verandert heet maturatie. Wanneer het contractiele fenotype naar het proliferatief/synthetisch fenotype verandert, dan wordt dit modulatie genoemd.

Maturatie: insuline en laminine

Maturatie van luchtweg gladde spiercellen kan onder andere geïnduceerd worden door insuline. De luchtweg gladde spiercel krijgt tijdens het maturatieproces een verlengde morfologie en een uitgebreid contractiel apparaat met de bijbehorende contractiele eiwitten [11]. Dit alles gebeurt na acht dagen behandeling van gladde spiercellen van rundertrachea met insuline. Bijkomend effect is een verlaagde mitogene reactie en er ontstaat dus een functioneel hypercontractiel, hypoproliferatief fenotype [13].

Voor insuline geïnduceerde maturatie is het extracellulaire matrixeiwit laminine belangrijk. Laminine is opgebouwd uit drie ketens; alpha, beta en gamma. Deze kunnen verschillende vormen aannemen die worden aangeduid met een cijfer. Op het moment zijn er vijf alpha-, vier beta- en drie gammaketens bekend in zoogdieren en met deze ketens kunnen er op zijn minst vijftien verschillende laminine-isovormen gevormd worden. Astmapatiënten

bevatten een verhoogde expressie van laminine $\alpha 2$ - en $\beta 2$ -ketens, vergeleken met gezonde controles [13].

Laminine is zowel bij de inductie als de instandhouding van het contractiele fenotype betrokken. Voor de verhoging van de insuline geïnduceerde laminineconcentratie, zijn de phosphatidyl inositide 3-kinase (PI 3-kinase) en Rho-kinase afhankelijkke signaaltransductieroutes nodig. Hiermee wordt de laminine-isovorm met de ketens $\alpha 2$ - $\beta 1$ - $\gamma 1$, tijdsafhankelijk verhoogd. Uit de studie van Dekkers *et al.* [13] blijkt dat vooral een belangrijke rol is weggelegd voor $\beta 1$ -bevattende laminines (met name de laminine-isovorm $\alpha 2$ - $\beta 1$ - $\gamma 1$) bij de inductie van een hypercontractiel fenotype door blootstelling aan insuline.

Maturatie: TGF- β

Naast insuline/laminine geïnduceerde maturatie, is er nog een factor die het contractiele fenotype kan promoten. Transforming growth factor- β (TGF- β) kan zorgen voor het switchen van gladde spiercellen naar een contractiel fenotype. Goldsmith *et al.* [14] hebben een model beschreven voor hypertrofie van de luchtweg gladde spiercellen waarbij de cellen worden behandeld met TGF- β . Hiermee wordt aangetoond dat TGF- β zorgt voor een vergroting van de luchtweg gladde spiercellen, de totale eiwitsynthese verhoogd en zorgt voor een toename van de contractiele eiwitexpressie (gladde spier α -actine (sm- α -actine) en gladde spier myosine zware keten (sm-MHC)). Daarnaast stimuleert TGF- β ook de formatie van actomyosine filamenten, deze zijn belangrijk bij spiercontractie [14]. De transcriptionele effecten van TGF- β zijn algemeen bekend, maar in de studie van Goldsmith *et al.* [14] wordt ook gesuggereerd dat mRNA translatie verhoogd wordt door TGF- β . TGF- β verhoogt namelijk sm- α -actine synthese in de aanwezigheid van actomycine D, een remmer van gentranscriptie. Dit laat zien dat TGF- β de translatie van α -actine mRNA naar een eiwit vergroot [14].

	<i>Stimulant maturatie</i>	<i>Stimulant modulatie</i>
Groefactoren	TGF- β	PDGF
Extracellulaire matrixeiwitten	Laminine	Fibronectine Collageen I
Overige factoren	Insuline	TNF- α

Tabel 1: Factoren die ofwel maturatie of modulatie beïnvloeden

Een overzicht van de verschillende factoren die als stimulant kunnen werken op maturatie of op modulatie. Er is tevens onderscheid gemaakt tussen groefactoren, extracellulaire matrixeiwitten en overige factoren.

Modulatie

Naast bovengenoemde mediators voor maturatie bestaan er natuurlijk ook factoren die modulatie van het gladde spierweefsel induceren. Het plaatsen van cellen in een primaire cultuur met een lage celdichtheid, aanwezigheid van bepaalde extracellulaire matrixeiwitten, cytokines en blootstelling aan mitogenen zijn factoren die het proliferatieve/synthetische fenotype promoten [10]. Hieronder wordt vooral aandacht besteed aan de extracellulaire matrixeiwitten fibronectine en collageen I en daarnaast aan de eiwitten TNF- α en PDGF.

Modulatie: fibronectine en TNF- α

Het extracellulaire matrixeiwit fibronectine speelt een belangrijke rol bij remodeling van glad spierweefsel. Het zet de gladde spiercellen aan om te switchen naar een functionele proliferatieve/synthetische staat doordat fibronectine een interactie aangaat met integrines op het celoppervlak. Integrines zijn receptoren op het celoppervlak die betrokken zijn bij de communicatie met de omgeving. Fibronectine wordt geproduceerd door endotheelcellen en door gladde spiercellen en is daarom te vinden in het basaalmembraan en in de interstitiële

matrix rond de gladde spiercellen. De eiwitexpressie van fibronectine kan door tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) worden opgereguleerd. Deze opregulatie verloopt via activatie van de ERK signaaltransductieroute [15].

Naast TNF- α zijn er nog andere factoren die kunnen zorgen voor een verhoging van de fibronectineproductie in gladde spiercellen, dat zo kan leiden tot proliferatie en migratie van de gladde spiercellen. Angiotensine II en vascular endothelial growth factor kunnen de fibronectine eiwitexpressie promoten [15]. Dit maakt fibronectine een belangrijke factor bij de inductie van het proliferatieve/synthetische fenotype.

Naast het verhogen van de fibronectineproductie, reguleert TNF- α mitogene processen en de expressie van proinflammatoire genen [16]. Uit de studie van Stewart *et al.* [17] blijkt dat TNF- α alleen geen effect heeft op celtaal of eiwitsynthese, maar verlaagd wel duidelijk het stimulerende effect van thrombine. Ook remt TNF- α de mitogene reacties van een aantal andere factoren (foetaal kalfsserum, epidermale groeifactor, thromboxaan A2) [17]. TNF- α kan veel verschillende en soms conflicterende reacties teweeg brengen in de cel, maar het grootste aandeel levert TNF- α als pro-ontstekingscytokine.

Modulatie: collageen I

Een ander interessant extracellulair matrixeiwit is collageen. TGF- β kan de synthese hiervan stimuleren in de luchtweg gladde spiercellen [18]. Er bestaan verschillende isovormen van collageen. Collageen I kan modulatie induceren en collageen IV, een basaal lamina eiwit, is juist betrokken bij fenotypeverandering richting een contractiele functie. In de studie van Orr *et al.* [19] is voor het eerst aangetoond dat collageen IV en collageen I een verschillend effect hebben op gladde spiercel fenotype modulatie en dat dit gebeurt via meerdere transductieroutes. Collageen I stimuleert de expressie van het ontstekingseiwit vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1. Collageen IV stimuleert de binding van serum response factor (SRF) aan de promotors van sm- α -actine en sm-MHC en verhoogt zo de expressie van deze contractiele eiwitten [19].

De vraag die hierbij interessant is, is hoe de cel onderscheid maakt tussen collageen I en collageen IV. Als beide collageen isovormen gedenatureerd zijn, dan kunnen ze binden aan de RGD-bindingsintegrine $\alpha\beta3$. Maar deze integrine onderscheidt de twee isovormen niet aangezien het beide gedenatureerde collageen isovormen bindt. Toch kan er onderscheid gemaakt worden aan de hand van integrinebinding doordat integrine $\alpha1\beta1$ vooral collageen IV bindt en integrine $\alpha2\beta1$ met name collageen I. Dit is in lijn met de kennis dat $\alpha2\beta1$ voornamelijk tot expressie komt bij het modulatieproces [19].

Modulatie: PDGF

Naast de extracellulaire matrixeiwitten fibronectine en collageen I, is er ook een belangrijke groeifactor die modulatie promoot. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB is een bekende stimulant van het proliferatieve/synthetische fenotype. PDGF-BB bestaat uit twee B subeenheden en vormt daarmee een homodimeer. Deze homodimeer kan binden aan de PDGF $\alpha\alpha$ -, $\alpha\beta$ - of de $\beta\beta$ -receptor. Na binding zal de receptor dimerizeren en door tyrosine kinase activiteit geautofosforyleerd worden. Dit zorgt voor signaaltransductie in de cel, waarbij ERK betrokken is [20].

Korte tijd geleden is een nieuwe variant van de PDGF familie ontdekt, PDGF-DD. Dit nieuwe lid is een PDGF $\beta\beta$ -receptor agonist en is ook een homodimeer, maar is pas na proteolytische splitsing geheel actief. In de studie van Thomas *et al.* [20] is onderzocht of PDGF-DD ook het proliferatieve/synthetische fenotype bevordert. Gladde spiercellen afkomstig uit de aorta van de rat zijn behandeld met de gesplitste en ongesplitste vorm van PDGF-DD. Het ongesplitste PDGF-DD had nagenoeg geen effect, terwijl het gesplitste PDGF-DD een significante downregulatie van sm- α -actine, sm-MHC, h1-calponine en myocardine teweeg bracht. Eén van de belangrijke conclusies van dit onderzoek is, mede door

bovengenoemde resultaten, dat PDGF-DD in de gesplitste vorm de modulatie van het gladde spiercel fenotype mogelijk bevordert [20].

Fenotypemarkers

De verschillende fenotypes die luchtweg gladde spiercellen kunnen uiten, kennen beide een eigen scala aan genen die tot expressie komen en de daar bijbehorende eiwitten die gesynthetiseerd worden. Een aantal van deze fenotypespecifieke eiwitten kunnen worden gebruikt als fenotypemarker (tabel 2). Het vaststellen van deze fenotypemarkers kan handig zijn in het onderzoek naar fenotypeplasticiteit en kan van belang zijn bij het onderzoek naar het fenotype van gladde spiercellen bij astma en andere ontstekingsziekten aan de luchtwegen [21].

De moleculaire markers van het contractiele gladde spiercel fenotype bestaan vooral uit eiwitten van het contractiele apparaat en cytoskelet geassocieerde eiwitten [3,10]. Hierbij horen sm-MHC, SM22, calponine, sm- α -actine, sm- γ -actine, *h*-caldesmon, desmine en smootheline [3,10,21].

Natuurlijk zijn er ook moleculaire markers van het proliferatieve/synthetische fenotype. Non-muscle myosine heavy chain (nm-MHC), *l*-caldesmon, vimentine, α/β -proteïne kinase C (PKC) en CD44 homing cellular adhesion molecule (HCAM) zijn allemaal één tot zes keer meer aanwezig in cellen met het proliferatieve fenotype dan in cellen met het contractiele fenotype [3,21].

<i>Markers contractiele fenotype</i>	<i>Markers proliferatief/synthetische fenotype</i>
sm-MHC	nm-MHC
SM22	α/β -PKC
sm- α -actine	CD44
sm- γ -actine	HCAM
calponine	vimentine
<i>h</i> -caldesmon	<i>l</i> -caldesmon
desmine	
smootheline	
caveolae / caveoline-1	
DGC	

Tabel 2: Markers van het contractiele en het proliferatieve/synthetische fenotype

In de studie van Halayko *et al.* [21] is geprobeerd de markers te identificeren van de gladde spiercel fenotypes van de luchtwegen. Er is onderzoek gedaan op primaire culturen van gladde spiercellen afkomstig van de trachea van honden, waarbij de effecten van verschillende micro-omgevingen op de groei en eiwitexpressie van deze culturen zijn geanalyseerd. Duidelijk werden de veranderingen in de hoeveelheid markereiwitten sm- α -actine en sm-MHC zichtbaar bij het verloop van de tijd. Deze veranderingen in hoeveelheid markereiwitten corresponderen goed met de pre-proliferatieve fase van de groeicurve. Binnen drie dagen na uitplaten en verandering van micro-omgeving nam de hoeveelheid markereiwitten af naar minder dan 25%. De hoeveelheid van het nm-MHC eiwit begon juist te stijgen bij het begin van de proliferatieve groeifase [21]. Deze resultaten spreken voor het sm- α -actine en sm-MHC als markers van het contractiele fenotype en nm-MHC als marker voor het proliferatieve fenotype.

Naast bovengenoemde moleculaire markers voor het contractiele fenotype zijn er in recentere studies nog twee andere markers ontdekt voor de maturatie van gladde spiercellen. Als eerste de caveolae, dit zijn hele kleine instulpinkjes van 50-100 nm in het plasmamembraan van cellen. Het aantal caveolae en ook de geassocieerde eiwitten caveoline-

1 en caveoline-2 gaan duidelijk omhoog tijdens spiercelmaturatie [3,10]. Ook lijkt er bewijs te zijn dat caveolae en caveoline-1 betrokken zijn bij de maturatie van gladde spiercellen. Caveolines kunnen een interactie aangaan met signaaleiwitten en remmen de activiteit van signaaltransductieroutes die betrokken zijn bij het reguleren van het proliferatieve fenotype [10].

De tweede recent ontdekte marker is dystrophine glycoproteïne complex (DGC). Het DGC speelt een cruciale rol bij de mechanische versterking van het sarcolemma (dun membraan rond spiervezels) tijdens opeenvolgende contracties. Daarnaast lijkt DGC ook een bijdrage te kunnen leveren aan de signaaltransductie in cellen. Tevens vindt er een duidelijke vermeerdering plaats van DGC tijdens maturatie en een vermindering in cellen die moduleren naar een proliferatief/synthetisch fenotype. Onder andere door deze bevindingen wordt het DGC nu gezien als een nieuwe marker voor maturatie van menselijke luchtweg gladde spiercellen [3].

Hoofdstuk 2: Intracellulaire signaaltransductieroutes bij fenotypeverandering

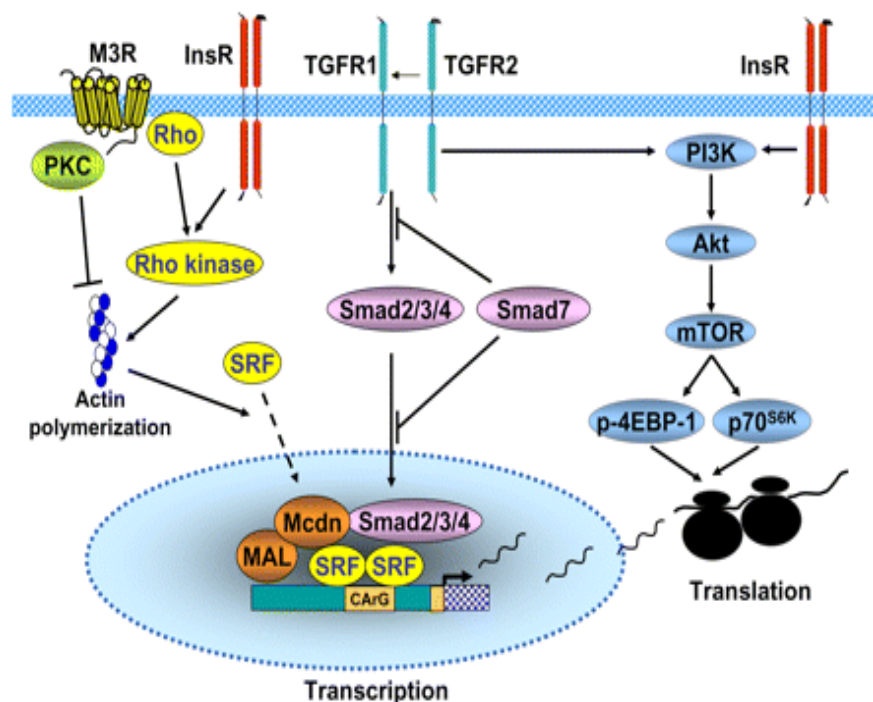
Na stimulatie van de cel door één van de factoren beschreven in het vorige hoofdstuk, worden verscheidene signaaltransductieroutes geactiveerd. Enerzijds kan de cel gestimuleerd zijn in de richting van maturatie en anderzijds in de richting van modulatie. Voordat de cel werkelijk van fenotype verandert, volgt er eerst nog een uitgebreide signaalcascade met vaak transcriptie en translatie tot gevolg. Het onderwerp van dit hoofdstuk is dan ook wat er allemaal in de cel gebeurt na stimulatie door één van de factoren.

Maturatie: Rho-kinase signaaltransductieroute

Voor maturatie naar een hypercontractiele gladde spiercel is het belangrijk dat er transcriptie geïnduceerd wordt van contractiele eiwitten zoals sm-MHC en sm- α -actine [10,11]. Hierbij zijn verschillende transcriptiefactoren betrokken, maar voordat deze transcriptiefactoren geactiveerd zijn, vindt er eerst een signaaltransductie plaats. De signaaltransductie die van belang is bij transcriptie en translatie van de contractiele eiwitten omvat de Rho-kinase en PI 3-kinase afhankelijke signaaltransductieroutes (figuur 3) [11].

Door bijvoorbeeld het stimuleren van een muscarine M₃ receptor, die gekoppeld is aan een G-eiwit, kan RhoA geïnduceerd worden. De inductie van RhoA gebeurt via de actie van Rho-specifieke guanine exchange factoren (RhoGEF). Het Rho-kinase kan nu actine polymerisatie stimuleren. Door de langere actine filamenten in het cytoplasma wordt de serum response factor (SRF) gestimuleerd om naar de nucleus te gaan. Protein kinase C (PKC) kan dit tegengaan doordat het actine depolymerisatie induceert. Wanneer SRF wel wordt gestimuleerd kan het in de nucleus de transcriptie van gladde spiercel specifieke genen reguleren. SRF bindt daarvoor aan CA_TG box elementen van de 5' promotors van de gladde spiercel specifieke genen. Deze promotors hebben tenminste twee van deze CA_TG box elementen die elk dimeren van SRF kunnen binden. SRF gaat in de kern een interactie aan met transcriptionele coactivatoren zoals myocardine en MAL/MKL1 (megakaryocytic acute leukemia/megakaryoblastic leukemia). Deze coactivatoren begeleiden SRF naar de gladde spiercel specifieke promotors. Op deze manier kan SRF met behulp van een actieve Rho-kinase signaaltransductieroute gladde spiercel specifieke genen reguleren [10,11].

Figuur 3:
Signaaltransductieroutes bij maturatie van de luchtweg gladde spiercel
De Rho-kinase en Smad route reguleren beide op hun eigen wijze de transcriptiefactor SRF en stimuleren zo gentranscriptie. Rho-kinase stimuleert actine polymerisatie en dit heeft tot gevolg dat SRF naar de nucleus migreert. Voor translatie is de PI 3-kinase route belangrijk. Met behulp van Akt, mTOR, p70 ribosomaal S6 kinase en 4E-BP1 kan translatie geïnitieerd worden [10].



Maturatie: PI 3-kinase signaaltransductieroute

Alleen de transcriptie van gladde spiercel specifieke genen is niet voldoende voor maturatie van een gladde spiercel tot het contractiele fenotype. Na transcriptie moeten er ook (contractiele) eiwitten geproduceerd worden door middel van translatie. Bij de translatie speelt de PI 3-kinase afhankelijke signaaltransductieroute een belangrijke rol (figuur 3). Deze route is tijdens het translatieproces actief en een aantal kinases is verhoogd gefosforyleerd. De belangrijkste van deze actieve, gefosforyleerde kinases zijn PI 3-kinase, Akt1, mTOR (mammalian target of rapamycin) en p70 ribosomaal S6 kinase. De eerste schakel in de route is PI 3-kinase, wanneer deze via actieve receptoren gestimuleerd is, zal het de volgende schakel, Akt1, activeren. Op zijn beurt zal Akt1, mTOR stimuleren. mTOR kan vervolgens naast het activeren van p70 ribosomaal S6 kinase, ook het eiwit 4E-BP1 fosforyleren. 4E-BP1 kan binden aan eIF4 (eukaryotic initiation factor) en op deze manier eIF4 activeren. Actief eIF4 kan eiwittranslatie initiëren en zo zorgen voor de komst van contractiele eiwitten en het maturatieproces van de gladde spiercel een grote stap vooruit laten maken [10]. P70 ribosomaal S6 kinase kan hier ook aan bijdragen door de fosforylatie van 40S ribosomaal eiwit S6 en dit zal zorgen voor een opregulatie van de translatie van mRNAs die onder andere coderen voor ribosomale eiwitten betrokken bij mRNA translatie, zo wordt de translationele capaciteit verhoogd [14, 22].

De PI 3-kinase afhankelijke signaaltransductieroute kan naast haar werk bij het translatieproces, ook invloed uitoefenen op de gentranscriptie. Dit gebeurt door middel van de fosforylatie van de Foxo forkhead transcriptie factor (Foxo4) door Akt1. Op deze manier wordt Foxo4 inactief gemaakt. Wanneer er geen fosforylatie plaatsvindt, dan bindt het actieve Foxo4 aan nucleair myocardine en remt hiermee de interactie met SRF. Hierdoor vindt er minder genexpressie plaats in gladde spiercellen. Dus wanneer Foxo4 inactief is, wordt de interactie tussen myocardine en SRF niet meer geremd en zullen er wel gentranscripten gemaakt worden. Een actieve PI 3-kinase signaaltransductieroute stimuleert indirect dus gladde spiercel specifieke gentranscriptie [3,10].

Maturatie: insuline en laminine

Zoals in hoofdstuk 1 besproken is kunnen insuline en TGF- β maturatie induceren. De door TGF- β geïnduceerde signaaltransductieroute zal onder het volgende tussenkopje besproken worden. Insuline grijpt aan op een insulinerceptor op het celoppervlak en activeert zo de PI 3-kinase afhankelijke en de Rho-kinase afhankelijke signaaltransductieroute. De signaaltransductie van deze routes is in bovenstaande alinea's beschreven, er is echter één aspect dat nog kort genoemd moet worden. Dat is de rol van het extracellulaire matrixeiwit laminine.

In de studie van Dekkers *et al.* [13] is onderzocht of laminines een functie hebben bij het induceren van een contractiel fenotype. Om dit te onderzoeken worden gladde spiercel strips uit rundertrachea geïncubeerd met insuline. Daarbij wordt gevarieerd in aan- en afwezigheid van twee laminine concurrerende peptiden (Tyr-Ile-Ser-Arg en Arg-Gly-Asp-Ser). Zo kan er gekeken worden naar de effecten van laminine op de contractiliteit van de strips. De resultaten duiden erop dat het insuline-geïnduceerde contractiele fenotype functioneel afhankelijk is van signaaltransductie via laminines die een α - en β 1-keten bevatten. Daarnaast zorgt insuline ook voor een verhoging van het voorkomen van de eiwitketens α 2, β 1 en γ 1, dit gebeurt via de PI 3-kinase en Rho-kinase afhankelijke routes [13].

Maturatie: TGF- β en de Smad route

TGF- β kan maturatie van een gladde spiercel naar een contractiel fenotype bevorderen. Hiervoor activeert TGF- β de TGF- β receptor-1, deze vormt vervolgens een dimeer met de constitutieve TGF- β receptor-2. Door deze TGF- β activatie wordt de Smad signaaltransductieroute gestimuleerd (figuur 3). Via de TGF- β receptordimeer worden de

regulatoire Smad-2, -3 en -4 gefosforyleerd en de Smads verplaatsen zich hierdoor naar de nucleus. Ook bij de Smad signaaltransductieroute is SRF betrokken, want Smad-2, -3 en -4 kunnen zich binden aan nucleair SRF en gentranscriptie bevorderen. Op deze manier kan TGF- β ervoor zorgen dat via de Smad signaaltransductieroute gladde spiercel specifieke gentranscriptie kan plaatsvinden [10,11]. Ook is hier nog een mogelijkheid voor autoregulatie van de signaaltransductieroute. Er is namelijk nog een remmend Smad, Smad-7, dat het effect van de regulatoire Smads op SRF teniet doet. Tevens is naast gentranscriptie ook translatie nodig, hiervoor is ook bij TGF- β geïnduceerde gentranscriptie de PI 3-kinase signaaltransductieroute nodig [10,11].

In de studie van Chen *et al.* [23] is onderzocht welke routes naast de Smad route nog meer een belangrijke rol spelen bij TGF- β geïnduceerde maturatie. Uit het onderzoek op vasculaire gladde spiercellen blijkt dat ook RhoA een kritische route is voor TGF- β geïnduceerde maturatie. Dit is onderzocht door middel van het blokkeren van de RhoA signaaltransductieroute. Er was een verminderde expressie van de markereiwitten sm- α -actine, SM22 α en calponine en ook werd na maturatie van de gladde spiercellen door middel van de blokkade de complete morfologische verandering en de contractie van de cellen teruggedraaid. De RhoA-route werd geblokkeerd door ROCK inhibitor Y27632 [23].

Maturatie: een overzicht

TGF- β en insuline kunnen allebei gladde spiercel maturatie bevorderen. Insuline-geïnduceerde gentranscriptie verloopt via de Rho-kinase afhankelijke signaaltransductieroute en TGF- β stimuleert de Smad route voor gladde spiercel specifieke gentranscriptie. Beide routes reguleren op hun eigen wijze de transcriptiefactor SRF (figuur 3). Ook is de RhoA-route betrokken bij TGF- β geïnduceerde gentranscriptie. Daarnaast is er nog de translatie, hiervoor is in beide gevallen de PI 3-kinase afhankelijke signaaltransductieroute cruciaal.

Modulatie: PDGF en SRF

SRF is niet alleen een transcriptiefactor voor de genen die coderen voor contractiele eiwitten, maar SRF kan ook gentranscripten maken die belangrijk zijn voor proliferatie. Wanneer SRF gladde spiercel specifieke gentranscripten maakt, zorgt een coactivator zoals myocardine ervoor dat SRF op de juiste plaats te werk gaat. Dit gebeurt in afwezigheid van groeifactoren. Als reactie op de aanwezigheid van groeifactoren, kan SRF ook een interactie aangaan met ternary complex factors (TCFs), een familie van ETS-domein transcriptiefactoren waarbij onder andere Elk-1 hoort. De transcriptie van contractiele genen zal sterk verminderen na competitieve binding van Elk-1. Proliferatieve genen, zoals *c-fos*, zullen juist geïnduceerd worden [3,10,24].

De vraag hoe Elk-1 een hogere bindingsaffiniteit kan krijgen voor SRF, zodat het de competitie wint van myocardine, is onderzocht in de studie van Wang *et al.* [24] met behulp van de groeifactor PDGF-BB die in hoofdstuk 1 besproken is. PDGF-BB downreguleert de expressie van genen die coderen voor contractiele eiwitten door een signaalcascade in werking te laten treden die begint met het activeren van MAP-kinases (mitogen activated protein-kinases). Deze MAP-kinases (MEK-1/2 in dit geval) kunnen vervolgens ERK-1/2 (extracellular signal-regulated kinase-1/2) fosforyleren. ERK-1/2 kan op zijn beurt Elk-1 fosforyleren. Hierdoor wordt de bindingsaffiniteit van Elk-1 voor SRF een stuk groter en zal het myocardine van SRF verdringen [24].

Dat de MAP-kinases MEK-1/2 een cruciale rol spelen bij PDGF-BB geïnduceerde fenotypeverandering, blijkt uit het experiment waarbij deze geremd worden. Het gevolg is dat er geen fosforylatie van Elk-1 plaatsvindt en ook heeft PDGF-BB geen effect op de gladde spiercel specifieke genexpressie die normaliter onderdrukt zou worden door PDGF-BB. Daarnaast wordt door de MAP-kinase remmer ook voorkomen dat myocardine wordt

vervangen door Elk-1 bij SRF. Hieruit blijkt dat de MAP-kinases cruciaal zijn voor PDGF geïnduceerde modulatie [24].

Naast groeifactor PDGF-BB is in hoofdstuk 1 ook PDGF-DD besproken. In de studie van Thomas *et al.* [20] wordt PDGF-DD een nieuwe mediator van modulatie van gladde spiercellen genoemd. Ook PDGF-DD kan contractiele eiwitten zoals sm- α -actine en SM22 downreguleren en ook is hier ERK1/2 van belang. Tevens spelen Elk-1 en SRF een rol [20].

In bovenstaande onderzoeken is er gewerkt met culturen van gladde spiercellen die niet afkomstig zijn uit de luchtwegen. Aangezien er onderscheid zou kunnen zijn tussen de gladde spiercellen van de vaten en van de luchtwegen, hebben Xie *et al.* [25] experimenten verricht op gladde spiercel strips uit de luchtwegen. Hieruit blijkt dat ERK1/2 ook een belangrijke rol speelt als signaaltransductieroute bij modulatie van de gladde spiercellen in de luchtwegen [25].

Modulatie: collageen I en fibronectine

Zoals hierboven is beschreven heeft PDGF-BB invloed op modulatie, maar wat nog niet is besproken zijn de stoffen die invloed hebben op de werking van deze groeifactor. Sommige extracellulaire matrixeiwitten kunnen namelijk PDGF-BB afhankelijke celproliferatie stimuleren, collageen I en fibronectine zijn hier voorbeelden van. De proliferatieve en synthetische functie van de gladde spiercellen komt hierbij meer tot uiting en dit draagt bij aan ontsteking en remodeling van de luchtwegwand bij astma [3,26,27].

In de studie van Xu *et al.* [28] is gekeken naar hoe veranderingen in de extracellulaire matrix celactiviteit kunnen reguleren. Er is gebruik gemaakt van menselijke celculturen van fibroblasten uit de huid, deze zijn op verschillende gels gebracht (verrijkt met collageen I of fibronectine) en gestimuleerd met PDGF-BB. Uit de studie blijkt dat, afhankelijk van de gel, verschillende integrinesubeenheden worden gepromoot door PDGF-BB (integrines bestaan uit een α/β -heterodimeer). Het mRNA van de integrinesubeenheden α_2 wordt gestimuleerd door PDGF-BB bij de collageen I gel, terwijl mRNA van de subeenheden α_3 en α_5 bij de fibronectine gel geïnduceerd wordt door PDGF-BB. Hierdoor wordt de suggestie gewekt dat veranderingen in de extracellulaire matrix ervoor zorgen dat cellen verschillend reageren op groeifactoren zoals PDGF [28].

Naast de studie die hierboven beschreven is zijn er ook soortgelijke studies uitgevoerd op menselijke gladde spiercellen uit de luchtwegen. Hierbij vestigt de studie van Nguyen *et al.* [26] de aandacht op verandering geïnduceerd door fibronectine en collageen I in de proliferatiesnelheid en vestigt de studie van Peng *et al.* [27] de aandacht op verandering van de cytokinesecretie geïnduceerd door fibronectine en collageen I. In beide studies wordt gekeken via welk mechanisme proliferatie of cytokinesecretie verloopt en met name welke specifieke β 1-integrines belangrijk zijn. Er wordt door Nguyen *et al.* [26] aangetoond dat de PDGF-BB geïnduceerde proliferatie van gladde spiercellen twee tot drie keer groter wordt door de aanwezigheid van collageen I of fibronectine. Uit de studie van Peng *et al.* [27] blijkt ook dat deze extracellulaire matrixeiwitten een toename van de secretie van cytokines teweeg kunnen brengen [26,27].

Daarnaast worden in beide studies de β 1-integrines aangewezen als belangrijke mediators voor proliferatie en cytokinesecretie. Door middel van integrine subeenheid-specifieke en heterodimeer-specifieke functieblokkerende antilichamen is onderzocht welke integrines belangrijk zijn bij PDGF-BB afhankelijke proliferatie versterkt door collageen I of fibronectine. Conclusie is dat verschillende β 1-integrines hierbij belangrijk zijn, met name α 2 β 1 (belangrijkste receptor voor collageen I), α 4 β 1 en α 5 β 1 (belangrijkste fibronectinereceptor) [26].

Fibronectine en collageen I kunnen ook het IL-1 β afhankelijke cytokinesecretie-sigitaal vergroten door middel van een β 1-integrine afhankelijk mechanisme. De studie van Peng *et al.* [27] laat zien dat α 2 β 1-, α 5 β 1-, α v β 1-integrines en een β 3-integrine α v β 3 nodig

zijn voor een vergrote IL-1 β afhankelijke secretie gestimuleerd door fibronectine. Daarnaast is α 2 β 1 juist een belangrijke mediator bij een collageen I gestimuleerde secretie [27].

Ter conclusie; de extracellulaire matrixeiwitten, collageen I en fibronectine, kunnen de proliferatie en cytokinesecretie van luchtweg gladde spiercellen bevorderen. Dit gebeurt via een β 1-integrine afhankelijk mechanisme waarbij meerdere integrines betrokken zijn en er een mechanistisch onderscheid gemaakt wordt tussen collageen I-stimulatie en fibronectinestimulatie.

Modulatie: TNF- α en fibronectine

Zoals in hoofdstuk 1 al is vermeld, kan TNF- α de fibronectineproductie versterken. En zoals hierboven is beschreven kan fibronectine de PDGF-afhankelijke celproliferatie versterken. Hieruit is te concluderen dat TNF- α een positief effect heeft op de celproliferatie. De resultaten van het onderzoek van Zhang *et al.* [15] wijzen uit dat TNF- α geïnduceerde opregulatie van fibronectine via de activatie van ROS (reactive oxygen species) en ERK (extracellular signal-regulated kinase) verloopt. TNF- α verhoogt significant de ROS-productie en zorgt voor ERK activatie [15].

Modulatie: een overzicht

PDGF-BB kan indirect Elk-1 fosforyleren waardoor deze een hogere bindingsaffiniteit voor SRF krijgt. Elk-1 zal nu makkelijker aan SRF binden dan myocardine en het Elk-1/SRF complex zal gentranscriptie van proliferatieve genen bevorderen in plaats van de contractiele genen. Tevens is besproken dat de extracellulaire matrixeiwitten collageen I en fibronectine het effect van PDGF-BB kunnen stimuleren waardoor de proliferatie en cytokinesecretie van luchtweg gladde spiercellen bevorderd worden. Fibronectine en collageen I stimuleren door middel van verschillende β 1-integrines het effect van PDGF-BB. TNF- α daarentegen stimuleert celproliferatie doordat het de fibronectineproductie stimuleert door middel van activatie van de ROS/ERK signaaltransductieroute.

Hoofdstuk 3: De consequenties van fenotypeplasticiteit

Consequenties van fenotypeplasticiteit: de luchtweg gladde spiercel

Een eerste opvallend gevolg van de fenotypeverandering is de verandering in morfologie van de gladde spiercellen. De cel met het contractiele fenotype is gestrekt zonder uitlopers, terwijl de proliferatieve/synthetische cel ronder is en uitlopers heeft (figuur 2) [10]. Daarbij komt dat de celinhoud ook verschillend is, een cel met het contractiele fenotype brengt veel contractiele eiwitten tot expressie zoals gladde spier-specifiek actine en myosine. Tevens komt ook de muscarine M₃ receptor tot expressie en regulatoire eiwitten die betrokken zijn bij contractie. Verder neemt het aantal caveolae sterk toe in vergelijking met het proliferatief/synthetische fenotype [7,10].

Naast weinig caveolae brengt het proliferatief/synthetische fenotype ook weinig contractiele eiwitten en M₃ receptoren tot expressie. Daar staat tegenover dat het volume van deze cellen voor een groot deel bestaat uit organellen met een synthetische functie zoals bijvoorbeeld het Golgi apparaat [7,10].

Zoals in de introductie al is besproken, functioneren de cellen met de verschillende fenotypes ook anders. De cel met het contractiele fenotype zal vooral sterk reageren op contractiele stimuli, terwijl het proliferatief/synthetische fenotype juist vooral gericht is op celdeling, synthese van organellen en secretie. De secretieproducten zijn chemokines, cytokines en extracellulaire matrixeiwitten. De extracellulaire matrixeiwitten die worden uitgescheiden stimuleren een hyperproliferatief fenotype. Daarbij komt dat bij deze cellen verlies van responsiviteit op contractiele agonisten optreedt [7,11,29].

In de studie van Gosens *et al.* [30] is onderzocht of deze fenotypeveranderingen ook in intact spierweefsel van de luchtwegen voorkomen en niet alleen een epifenomeen zijn in celkweekexperimenten. Verschillende studies tonen al aan dat extracellulaire matrixeiwitten een mogelijke rol hebben bij fenotypeverandering. Aangezien cel-cel contact en extracellulaire matrixcomponenten intact blijven bij experimenten met spierweefsel, in tegenstelling tot experimenten met spiercellen, is het relevant om onderzoek te doen naar fenotypeverandering in intact spierweefsel. Gosens *et al.* [30] tonen aan dat intact runderspierweefsel uit de luchtwegen gevoelig is voor fenotypeveranderingen. Gevonden is dat serum en verschillende groeifactoren (PDGF, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) en epidermal growth factor (EGF)) een minder contractiel fenotype teweeg brengen [30]. Deze bevindingen zijn in lijn met de resultaten gevonden bij celkweekexperimenten.

Consequenties van fenotypeplasticiteit: de pathogenese van astma

De fenotypeplasticiteit van de gladde spiercellen van de luchtwegen is verantwoordelijk voor het bestaan van de drie karakteristieken van astma: luchtweghyperreactiviteit, luchtwegremodeling en ontsteking van de luchtwegen. Tegenwoordig is duidelijk dat deze drie karakteristieken naast elkaar en met elkaar zorgen voor het ziektebeeld astma. Hieronder zal beschreven worden hoe de drie kenmerken met elkaar geïntegreerd zijn en hoe dit mogelijk gemaakt wordt door fenotypeplasticiteit.

Hyperreactiviteit van de gladde spiercellen zorgt ervoor dat acuut de diameter van de luchtwegen sterk verkleind wordt bij blootstelling aan allergenen. Zoals eerder genoemd kent hyperreactiviteit van de luchtwegen twee vormen. De acute vorm is een omkeerbaar proces en is geassocieerd met periodes van verhoogde luchtwegontsteking die worden veroorzaakt door omgevingsfactoren zoals blootstelling aan allergenen. Ontstekingscellen die bij astma betrokken zijn, zijn in staat om producten uit te scheiden die contractie kunnen induceren, bovendien kunnen zij de contractiele effecten van andere verbindingen versterken. Ook kan dit leiden tot een minder goede bescherming van het luchtwegepitheel. Het luchtwegepitheel

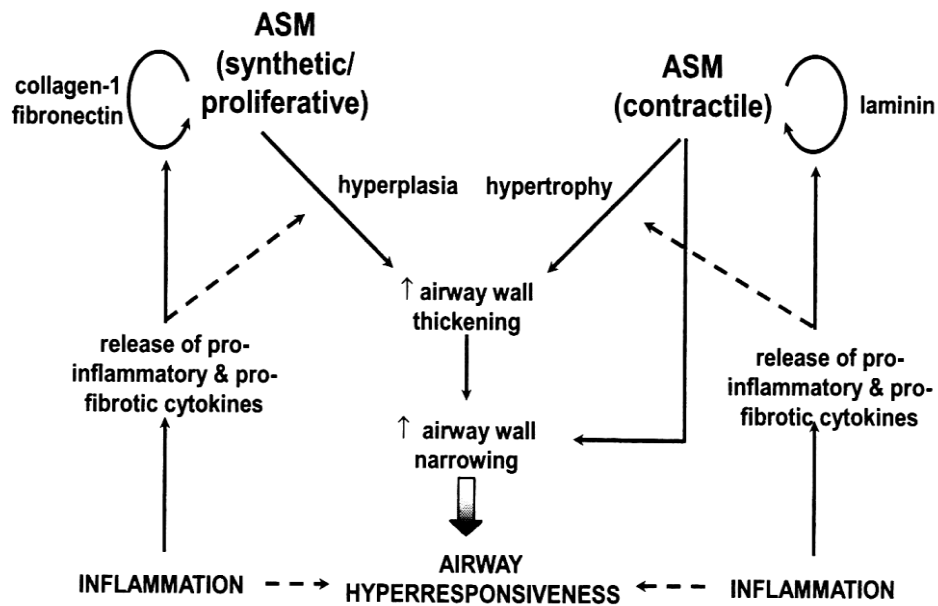
kan zowel op actieve wijze (bijvoorbeeld door het uitscheiden van relaxerend stikstofmonoxide) als op passieve wijze (de barriërefunctie) bescherming bieden tegen luchtwegvernauwing [7].

In de studie van Crimi *et al.* [31] is de relatie tussen acute ontsteking, veroorzaakt door blootstelling aan allergenen, en hyperreactiviteit van de luchtwegen onderzocht bij patiënten met chronische astma. Er werd geen significante relatie gevonden tussen de mate van luchtweghyperreactiviteit en het aantal ontstekingscellen, waarschijnlijk is er geen direct causaal verband tussen ontsteking en hyperreactiviteit. De suggestie wordt gegeven dat andere factoren, zoals luchtwegremodeling en autonome dysfunctie, voornamelijk verantwoordelijk zijn voor de variatie tussen de individuen in luchtweghyperreactiviteit [31].

De chronische of persistente vorm van hyperreactiviteit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door luchtwegremodeling wat op zijn beurt weer wordt veroorzaakt door persistente ontsteking van de luchtwegen [8]. Echter, de heersende opvatting is dat niet alleen remodeling van de luchtwegen, maar ook persistente hyperreactiviteit wordt veroorzaakt door chronische ontsteking van de luchtwegen. Het causale verband tussen deze drie factoren in patiënten met astma is nog niet zeker. Recente onderzoeken laten zien dat kinderen met een hoog risico op het ontwikkelen van astma al tekenen vertonen van luchtwegremodeling, terwijl er geen duidelijke relatie wordt gevonden met ontsteking van de luchtwegen en astmasymptomen [32-34]. Hierdoor ontstaat het nieuwe idee dat chronische ontsteking van de luchtwegen en remodeling van de luchtwegen parallelle gebeurtenissen zijn in plaats van opvolgende gebeurtenissen. Of er een causaal verband tussen persistente hyperreactiviteit en remodeling is, moet nog blijken uit toekomstige onderzoeken. Daarbij moet eraan gedacht worden dat in sommige onderzoeken structurele veranderingen in de luchtwegen als een goede verklaring wordt gegeven voor een verhoging van de luchtwegreactiviteit [8, 35, 36]. Echter, uit andere onderzoeken blijkt dat luchtwegremodeling juist een verklaring zou kunnen zijn voor een lagere hyperreactiviteit van de luchtwegen [8, 37], doordat remodeling zorgt voor het star worden van de luchtwegen en zo bescherming biedt tegen luchtwegvernauwing.

Bij al deze drie karakteristieken speelt de gladde spiercel van de luchtwegen een rol. Doordat de luchtweg gladde spiercel een plastisch fenotype heeft, kan de functie van de cellen veranderen en is het mogelijk dat één celtype bijdraagt aan de drie verschillende processen die bij astma een rol spelen. Dit is onder andere aangetoond in de studie van Gosens *et al.* [7], waar wordt laten zien dat de vermindering in contractiliteit sterk gecorreleerd is met hun proliferatieve respons. De vermindering in contractiliteit wordt veroorzaakt doordat individuele cellen switchen naar het proliferatieve fenotype.

Een andere functionele verandering van de gladde spiercel, is het verschil in de productie van extracellulaire matrixeiwitten. Gekweekte gladde spiercellen van astmapatiënten produceren verhoogde hoeveelheden, en in een andere samenstelling, extracellulaire matrixeiwitten. Bij het proliferatief/synthetische fenotype spelen vooral de eiwitten collageen I en fibronectine een rol, bij het contractiele fenotype gaat het met name om laminine. Deze veranderingen in de micro-omgeving van de luchtweg gladde spiercellen stimuleren structurele veranderingen van de luchtwegwand; luchtwegremodeling. Zoals al eerder is genoemd heeft luchtwegremodeling op zijn beurt ook effect op luchtweghyperreactiviteit. Zo beïnvloedt ook de extracellulaire matrix de complexiteit van de pathogenese van astma waarin de gladde spiercel van de luchtwegen, met haar vermogen om van fenotype te kunnen veranderen, een centrale rol speelt (figuur 4) [11].



Figuur 4:
Schematische weergave van de processen rond fenotypeplasticiteit en de pathogenese van astma

Ontsteking heeft een direct effect op luchtweg-hyperreactiviteit en een indirect effect via luchtwegremodeling. Ook extracellulaire matrixeiwitten kunnen luchtwegremodeling stimuleren [11].

Conclusie

Astma is een chronische ontsteking van de luchtwegen en drie karakteristieken spelen hierbij een belangrijke rol; ontsteking, hyperreactiviteit en remodeling van de luchtwegen. Een belangrijke schakel tussen deze kenmerken is de gladde spiercel in de luchtwegen. Deze cel maakt het bestaan van de verschillende klinische symptomen van astma mogelijk doordat de cel van fenotype kan veranderen.

De micro-omgeving van de gladde spiercellen speelt een grote rol bij het induceren van maturatie (het switchen van een proliferatief/synthetisch fenotype naar een contractiel fenotype) dan wel modulatie (het switchen van een contractiel fenotype naar een proliferatief/synthetisch fenotype). Voornamelijk groeifactoren en extracellulaire matrixeiwitten kunnen fenotypeverandering teweegbrengen via een reeks van intracellulaire signaaltransductieroutes. De extracellulaire matrix van astmapatiënten is zo samengesteld dat het de fenotypeverandering en hierdoor de pathogenese van astma ondersteunt.

De consequentie van deze fenotypeplasticiteit voor de gladde spiercellen is een verandering van morfologie, celinhoud en functie. Deze veranderingen brengen gevolgen met zich mee voor de pathogenese van astma, hierdoor is het mogelijk dat astma een complex ziektebeeld kent dat bestaat uit geïntegreerde processen waarbij de drie karakteristieken een grote rol spelen. Verschillende soorten onderzoek zijn verricht om de relatie tussen hyperreactiviteit, ontsteking en remodeling uit te zoeken. Of er echter een causaal verband is tussen persistente hyperreactiviteit en remodeling, moet nog blijken. Ook moet er nog meer onderzoek gedaan worden naar de vraag of chronische ontsteking en remodeling van de luchtwegen parallelle gebeurtenissen zijn of op elkaar volgende. Tenslotte moet duidelijk worden of luchtwegremodeling een verklaring is voor een lagere hyperreactiviteit van de luchtwegen of juist een hogere hyperreactiviteit.

Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het doen van deze onderzoeken, is door het vergaren van meer kennis over de pathogenese van astma, de mogelijkheid te verkrijgen om met behulp van deze kennis een goede en volledige therapie voor astma te vinden. Op dit moment is er vooral medicatie die de acute effecten van astma tegengaat, maar het is ook van belang dat er een doeltreffende therapie tegen de chronische effecten van astma wordt ontwikkeld.

De chronische ontsteking van de luchtwegen draagt bij aan hyperreactiviteit van de luchtwegen en zo verlies van longfunctie. De chronische beschadigingen aan de longen kunnen elkaar steeds meer versterken en worden niet verholpen met medicatie gericht tegen de acute effecten van astma. Het is dus onvoldoende om alleen de acute effecten van astma aan te pakken.

Zoals duidelijk is geworden, kent astma een complex ziektebeeld waarin vele facetten een rol spelen. Daarom zal combinatietherapie overwogen moeten worden, zodat astma op verschillende vlakken kan worden bestreden. Ook de interindividuele variatie van patiënten op een bepaalde behandeling mag niet vergeten worden. Uit farmacogenetische studies is gebleken dat 60-80% van de interindividuele variatie in reactie op een behandeling te wijten is aan genetische verschillen [38]. Hierom is het ook van belang dat er farmacogenetisch onderzoek gedaan wordt, zodat de reactie van individuele patiënten op therapie voorspeld kan worden aan de hand van zijn of haar genetische eigenschappen. Het doel is om de loci te identificeren die de reactie op de astmatherapie beïnvloeden. Uiteindelijk moet dit leiden tot een geïndividualiseerde astmatherapie.

Het mag duidelijk zijn dat fenotypeplasticiteit van de luchtweg gladde spiercel een centrale rol speelt in de pathogenese van astma en dat onderzoek hiernaar ons stap voor stap dichterbij een doeltreffende therapie voor astma brengt.

Referenties

- 1) Astmafonds. Factsheet astma 2007. Beschikbaar via: www.astmafonds.nl/pdf/factsheet_astma.pdf Geraadpleegd 25-05-2009
- 2) Payne DNR, Rogers AV, Delroth EA, et al. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003; 167: 78-82.
- 3) Hirota JA, Nguyen TTB, Schaafsma D, et al. Airway smooth muscle in asthma: Phenotype plasticity and function. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2008; 21: 1-9.
- 4) Damera G, Tliba O, Panettieri RA. Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2008; 21: 1-7.
- 5) Zuyderduyn S, Sukkar MB, Fusi A, et al. Treating asthma means treating airway smooth muscle cells. *European Respiratory Journal* 2008; 32: 265-274.
- 6) Halayko AJ, Amrani Y. Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2003; 137: 209-222.
- 7) Gosens R. Plasticity of airway smooth muscle phenotype in airway remodeling. Proefschrift Rijksuniversiteit Groningen; 2004. 192 p.
- 8) Meurs H, Gosens R, Zaagsma J. Airway hyperresponsiveness in asthma: lessons from in vitro model systems and animal model. *European Respiratory Journal* 2008; 32: 487-502.
- 9) Sonoma County Asthma Coalition. Beschikbaar via: http://www.sonomaasthma.org/display/test_2060asthma2.jpg Geraadpleegd 21-10-09
- 10) Halayko AJ, Tran T, Gosens R. Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: Role of caveolae and caveolins. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2008; 5:80-88.
- 11) Halayko AJ, Gosens R, Tran T. Airway smooth muscle phenotypic and functional plasticity. In Chung K.F., redacteur. *Airway smooth muscle in asthma and COPD*. England: Wiley; 2008: 71-86.
- 12) Pelaia G, Renda T, Gallelli L, et al. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. *Respiratory Medicine* 2008; 102: 1173-1181.
- 13) Dekkers BGJ, Schaafsma D, Tran T, et al. Insulin-induced laminin expression promotes a hypercontractile airway smooth muscle phenotype. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2009; 0: 2008-0251OCv1.
- 14) Goldsmith AM, Bentley JK, Zhou, Jia Y, Bitar KN, Fingar DC, Hershenson MB. Transforming growth factor- β induces airway smooth muscle hypertrophy. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2006; 34: 247-254.
- 15) Zhang H, Wang S. Noto Ginsenoside R1 inhibits TNF- α -induced fibronectin production in smooth muscle cells via the ROS/ERK pathway. *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 40: 1664-1674.
- 16) Tliba O, Tliba S, Huang CD, Hoffman RK, DeLong P, Panettieri RA, Amrani Y. Tumor Necrosis Factor α modulates airway smooth muscle function via the autocrine action of interferon. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 50615-50623.
- 17) Stewart AG, Tomlinson PR, Fernandes DJ, Wilson JW, Harris T. Tumor necrosis factor alpha modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1995; 12: 110-119.
- 18) Coutts A, Chen G, Stephens N, Hirst S, Douglas D, Eichholtz T, Khalil N. Release of biologically active TGF- β from airway smooth muscle cells induces autocrine

- synthesis of collagen. *American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology* 2001; 280: L999-L1008.
- 19) Orr AW, Lee MY, Lemmon JA, et al. Molecular mechanisms of collagen isotype-specific modulation of smooth muscle cell phenotype. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2009; 29: 225-231.
 - 20) Thomas JA, Deaton RA, Hastings NE, et al. PDGF-DD a novel mediator of smooth muscle cell phenotypic modulation, is upregulated in endothelial cells exposed to atherosclerosis-prone flow patterns. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 2009; 296: H442-H452.
 - 21) Halayko AJ, Salari H, Ma X, et al. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* 1996; 14: L1040-L1051.
 - 22) Halayko AJ, Kartha S, Stelmack GL, McConville J, Tam J, Camoretti-Mercado B, Forsythe SM, Hershenson MB, Solway J. Phosphatidylinositol-3 kinase/mammalian target of rapamycin/p70S6K regulates contractile protein accumulation in airway myocyte differentiation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2004; 31: 266-275.
 - 23) Chen S, Crawford M, Day RM, et al. RhoA modulates Smad signaling during transforming growth factor- β -induced smooth muscle differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(3): 1765-1770.
 - 24) Wang Z, Wang D, Hockemeyer D, et al. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* 2004; 428: 185-189.
 - 25) Xie M, Liu X, Xu Y, et al. ERK1/2 signaling pathway modulates the airway smooth muscle cell phenotype in the rat model of chronic asthma. *Respiration* 2007; 74: 680-690.
 - 26) Nguyen TT, Ward JPT, Hirst SJ. β 1-Integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005; 171: 217-223.
 - 27) Peng Q, Lai D, Nguyen TT, et al. Multiple β 1 integrins mediate enhancement of human airway smooth muscle cytokine secretion by fibronectin and type 1 collagen. *The Journal of Immunology* 2005; 174: 2258-2264.
 - 28) Xu J, Clark RA. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *The Journal of Cell Biology* 1996; 132: 239-249.
 - 29) Moir LM, Leung SY, Eynott PR, et al. Repeated allergen inhalation induces phenotypic modulation of smooth muscle in bronchioles of sensitized rats. *American Journal of Physiology* 2003; 284: L148-L159.
 - 30) Gosens R, Meurs H, Bromhaar MM, McKay S, Nelemans SA, Zaagsma J. Functional characterization of serum- and growth factor-induced phenotypic changes in intact bovine tracheal smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 2002; 137: 459-466.
 - 31) Crimi E, Spanevello A, Neri M, et al. Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998; 157: 4-9.
 - 32) Martinez FD. Asthma treatment and asthma prevention: a tale of 2 parallel pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007; 119: 30-33.
 - 33) Barbato A, Turato G, Baraldo S, et al. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2006; 174: 975-981.
 - 34) Payne DN, Rogers AV, Adelroth E, et al. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003; 167: 78-82.

- 35) An SS, Bai TR, Bates JH, et al. Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. *European Respiratory Journal* 2007; 29: 834–860.
- 36) Halayko AJ, Tran T, Ji SY, Yamasaki A, Gosens R. Airway smooth muscle phenotype and function: interactions with current asthma therapies. *Current Drug Targets* 2006; 7: 525–540.
- 37) McParland BE, Macklem PT, Paré PD. Airway wall remodeling: friend or foe? *Journal of Applied Physiology* 2003; 95: 426–434.
- 38) Weis ST, Litonjua AA, Lange C, et al. Overview of the pharmacogenetics of asthma treatment. *The Pharmacogenomics Journal* 2006; 6: 311-326.