

## De allergieopwekkende capaciteit van huisstofmijt wordt bepaald door het effect op de barrière-functie en pro-inflammatoire cytokineproductie in luchtwegepitheel

The allergenic capacity of house dust mite depends on its effect on barrier function and pro-inflammatory cytokine production in airway epithelium

**Auteurs:** S. Post, A.J.M. van Oosterhout, I.H. Heijink

**Trefwoorden:** allergisch astma, barrièrefunctie, huisstofmijt, luchtwegepitheel, luchtwegontsteking

**Keywords:** airway epithelium, airway inflammation, allergic asthma, barrier function, house dust mite

### Samenvatting

Astmapatiënten die allergisch zijn voor huisstofmijt, het meest voorkomende luchtwegallergeen, reageren met een door T-helper 2-(Th2)cellen gedreven ontstekingsreactie in de luchtwegen, terwijl deze immunologische reactie uitblijft bij gezonde personen. Tot op heden is onbekend wat ervoor zorgt dat astmapatiënten een allergische luchtwegontsteking ontwikkelen in reactie op ingeademd huisstofmijt, hoewel steeds meer onderzoek aantoont dat het luchtwegepitheel hierbij mogelijk een belangrijke rol speelt. Het luchtwegepitheel komt als eerste in contact met het ingeademde allergeen en vormt een belangrijke barrière. Het epitheel kan onder meer beschadigd raken na contact met een allergeen, waardoor de barrière wordt verstoord wat mogelijk leidt tot het aanmaken van pro-inflammatoire cytokinen die allergische luchtwegontsteking bevorderen. Huisstofmijt heeft een complexe samenstelling, en van meerdere componenten in huisstofmijt is bekend dat het verlies van epitheelbarrièrefunctie en/of aanmaak van pro-inflammatoire cytokinen door het epitheel kan veroorzaken. Om beter inzicht te krijgen in de effecten van huisstofmijt op luchtwegepitheel en de gevolgen voor sensibilisatie en ontwikkeling van allergisch astma, hebben we de effecten van verschillende huisstofmijtextracten vergeleken op luchtwegepitheel in vitro en in een muismodel voor astma in vivo. We vonden dat serine- en cysteineproteasen niet essentieel zijn, maar dat het vermogen van huisstofmijt om de epitheelbarrière aan te tasten bepalend is voor allergische sensibilisatie.

*(Ned Tijdschr Allergie & Astma 2013;12:10-17)*

**Auteurs:** mw. S. Post, junior-onderzoeker, dhr. prof. dr. A.J.M. van Oosterhout, hoogleraar en mw. dr. I.H. Heijink, senior-onderzoeker, afdeling Pathologie en Medische Biologie, Laboratorium Allergologie en Longziekten, Universitair Medisch Centrum Groningen.

Correspondentie graag richten aan: mw. dr. I.H. Heijink, senior-onderzoeker, afdeling Pathologie en Medische Biologie, Laboratorium Allergologie en Longziekten, Universitair Medisch Centrum Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ Groningen, e-mailadres: h.i.heijink@umcg.nl.

**Belangenconflict:** geen gemeld.

**Financiële ondersteuning:** Astma Fonds (3.2.07.019)

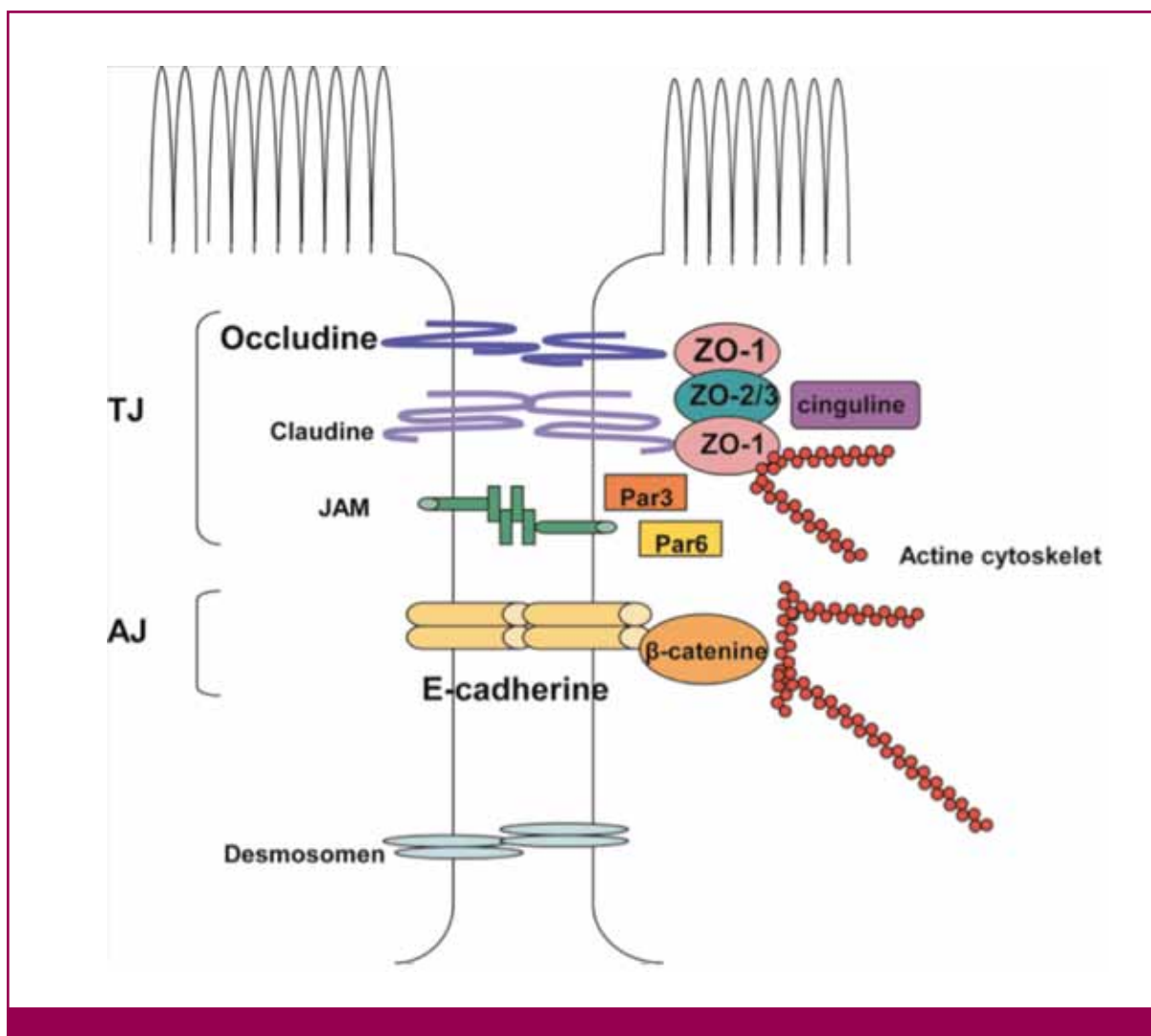
## Summary

Asthma patients who are allergic to house dust mite, the most common aeroallergen, respond with a Th2-driven inflammatory reaction in the airways, while this immune response does not occur in healthy persons. At present, it is still unknown why certain individuals become sensitized to house dust mite, although increasing evidence suggests that the airway epithelium may play an important role in this process. Inhaled allergens first encounter the airway epithelium, which forms an important structural barrier. Allergens may inflict damage to the epithelium and epithelial damage with loss of barrier function may lead to increased expression of pro-inflammatory cytokines. House dust mite is a complex allergen composed of different components, some of which are known to cause loss of barrier function as well as the expression of pro-inflammatory cytokines by the airway epithelium. To obtain more insight in the effects of house dust mite on airway epithelium and the subsequent allergic sensitization and development of allergic asthma, we compared the effects of several house dust mite extracts on bronchial airway epithelium in vitro as well as in vivo in a mouse model for asthma. Our data show that serine and cysteine proteases were not responsible for the allergic response to house dust mite, but that effects on the epithelial barrier are decisive for its allergenic properties.

## Inleiding

Allergisch astma is een steeds meer voorkomende chronische ziekte, gekarakteriseerd door reversibele luchtwegvernauwing, luchtweghyperreactiviteit en een chronische ontstekingsreactie in de luchtwegen. Astmapatiënten reageren op het inhaleren van stoffen waarvoor ze allergisch zijn (de zogeheten allergenen) met een acute IgE-afhankelijke mestceldegranulatie, een ontstekingsreactie in de luchtwegen, luchtweg-obstructie en luchtweghyperreactiviteit. Het is tot op heden onbekend waarom astmapatiënten reageren op huisstofmijtallergenen met luchtwegontsteking. In de luchtwegen vormt het epitheel de primaire barrière tegen de buitenwereld en geïnhalede allergenen en het voorkomt dat schadelijke stoffen in de submucosa terechtkomen. Deze barrière wordt gevormd door de adhesie tussen naburige epitheelcellen, via moleculen die betrokken zijn bij de vorming van de zogeheten 'tight junctions' (TJ's), waaronder de eiwitten zona occludens-1 (ZO-1), occludine, claudines 1-5 en 'junctional adhesion molecules' (JAM's) en de 'adherens junctions' (AJ's), waaronder het eiwit E-cadherine. De TJ's zijn grotendeels verantwoordelijk voor de ondoordringbaarheid van het luchtwegepitheel, terwijl gedacht wordt dat E-cadherine verantwoordelijk is voor de opbouw van deze TJ's.<sup>1</sup> Al deze eiwitten zijn essentieel voor de vorming van de cel-celcontacten en barrièrefunctie van het luchtwegepitheel (Figuur 1).<sup>2</sup> Wij hebben aangetoond dat epitheel na verlies van E-cadherine een verminderde barrièrefunctie vertoont,

waardoor allergenen makkelijker de onderliggende dendritische cellen (DC's) kunnen bereiken in de submucosa, en het epitheel ook meer proallergische cytokinen gaat aanmaken.<sup>3</sup> Bij patiënten met allergisch astma zijn bepaalde cel-celcontacteiwitten, zoals E-cadherine en ZO-1, verminderd aanwezig in het luchtwegepitheel waardoor het contact tussen de cellen minder sterk wordt.<sup>4</sup> Momenteel is het echter onbekend of deze vermindering van cel-celcontacten de oorzaak dan wel het gevolg is van de allergische ontstekingsreactie in de luchtwegen van astmapatiënten. Opmerkelijk genoeg komen veel van de onlangs ontdekte astmagevoeligheidsgenen, inclusief de *DPP10*, *GPCRA*, *CHI3L1* en *PCDHI* (lid van de protocadherinefamilie) tot expressie in het luchtwegepitheel, wat een belangrijke rol voor epitheel in astma onderstreept. Bovendien is bekend dat bepaalde E-cadherinegen (*CDH1*) polymorfismen zijn geassocieerd met luchtwegepitheelveranderingen, luchtwegontstekingen en vermindering van longfunctie bij astmapatiënten die corticosteroïden gebruiken.<sup>5,6</sup> Dit geeft aan dat veranderingen in de cel-celcontacten van het epitheel van belang zouden kunnen zijn in de ontwikkeling van allergisch astma. Dit wordt verder ondersteund doordat is gebleken dat de structurele veranderingen in het luchtwegepitheel van kinderen vaak al vóór de diagnose van astma optreden.<sup>7</sup> Naast zijn barrièrefunctie is het epitheel belangrijk voor het aansturen van het afweersysteem, door



**Figuur 1. Structuur van het 'tight-' en 'adherens junction'-complex in het luchtwegepitheel.** De 'tight junctions' (TJ) bevinden zich aan de apicale kant van de cel en worden gevormd door interactie tussen de moleculen occludine, claudines 1-5 en 'junctional adhesion molecule' (JAM), welke zijn verbonden met het actinecytoskelet van de cel via respectievelijk zonula occludens (ZO) 1-3, en de 'protease activated receptor'(Par)-eiwitten. De adherens junctions (AJ) bevinden zich aan de basolaterale kant van de Tj's en vormen intracellulaire verbindingen, waarbij het eiwit E-cadherine als belangrijkste adhesiemolecuul functioneert. E-cadherine is verbonden met het cytoskelet via  $\beta$ -catenine. Meest basaal bevinden zich de desmosomen.

de aanmaak van cytokinen die allergische luchtwegontsteking bevorderen. In luchtwegepitheel komen zogeheten 'pattern recognition receptors' (PRR's) tot expressie, waartoe de proteaseactiverende receptoren (PAR's), dectin-1-receptoren en toll-like receptoren (TLR's) behoren.<sup>8-10</sup> Deze receptoren herkennen lichaamsvreemde stoffen (zoals bacteriën, virussen, schimmels), wat ertoe dient dat het epitheel signalen van gevaar aan zijn omgeving kan doorgeven. Huisstofmijextract is complex van samenstelling, en van meerdere componenten in huisstofmijt is bekend dat

ze bepaalde PRR's activeren, waardoor deze receptoren mogelijk een rol kunnen spelen in de ontwikkeling van astma.<sup>11</sup>

### Reactie van epitheel op huisstofmijt

Tot op heden is het nog onduidelijk welke componenten in huisstofmijt de reactie van het luchtwegepitheel na de inademing veroorzaken. Huisstofmijt bevat meerdere verschillende proteasen, waarvan de allergenen *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) 1,

**Tabel 1. Vergelijking van huisstofmijtpreparaten van verschillende bedrijven.**

	Huisstofmijt (Citeq)	Huisstofmijt (ALK)	Huisstofmijt (Greer)
Totale proteaseactiviteit	+++	++	+
Serineproteaseactiviteit	++	++	+
Cysteïneproteaseactiviteit	+	+	+
Totale proteaseactiviteit na hittebehandeling	+	+	+
Chitinaseactiviteit	++	+++	++
Chitinaseactiviteit na hittebehandeling	-	-	-
Endotoxinespiegels	++	-	+

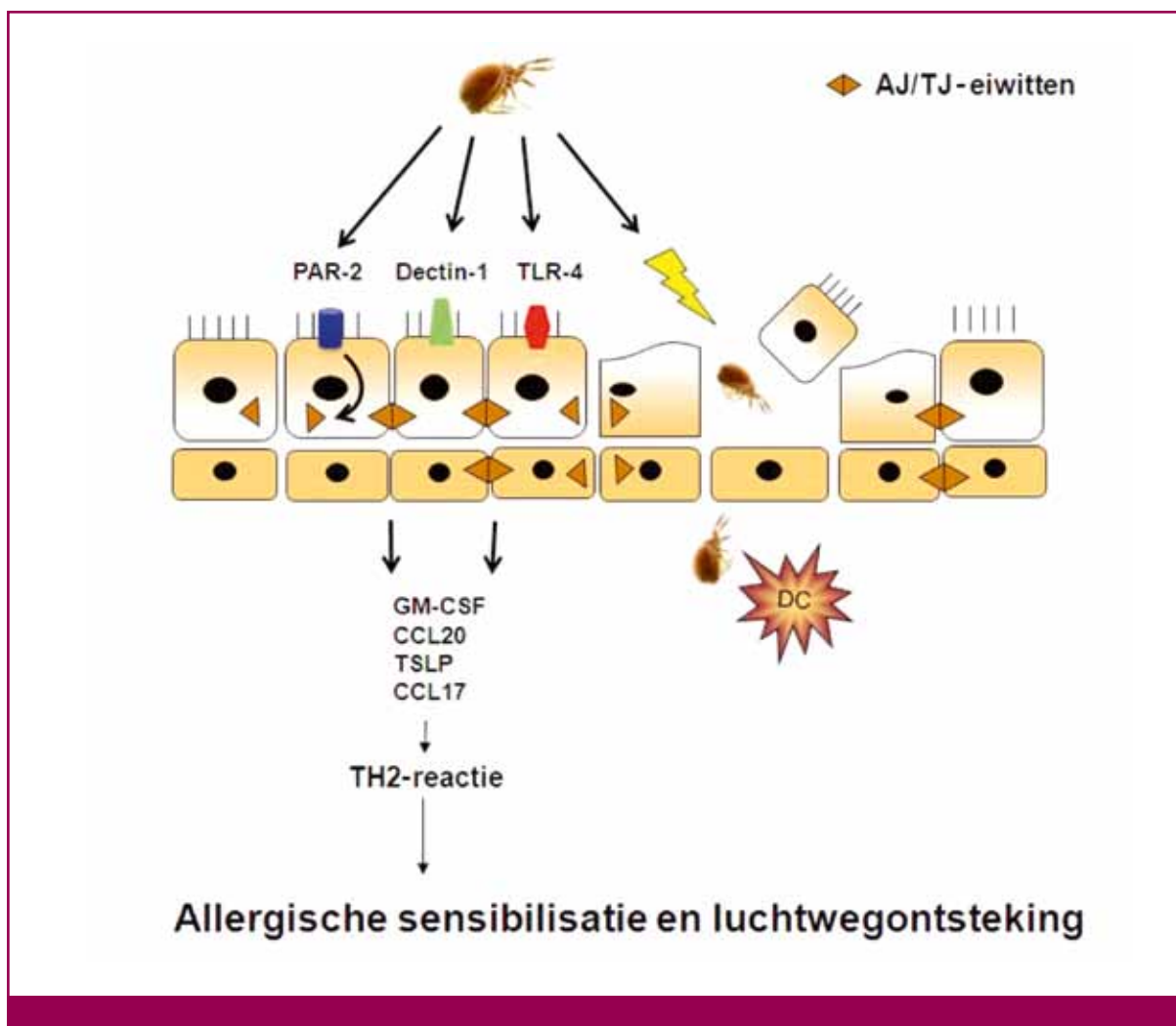
+++ = zeer veel, ++ = veel, + = weinig, - = geen. Bron: Post et al. 2012<sup>26</sup>

3, 6 en 9 de serine- en cysteïneproteaseactiviteit hebben. Aanvankelijk werd beschreven dat de eiwitknippende serineproteasen verantwoordelijk zijn voor de afbraak van ZO-1, occludine en ook in een mindere mate E-cadherine.<sup>12</sup> Het activeren van PAR-2 in epitheel door serineprotease in huisstofmijt kan ook immunologische tolerantie voor het geïnhaleerd eiwit zoals ovalbumine doorbreken en allergie opwekken in een muismodel.<sup>13</sup> Ook is beschreven dat het activeren van de PAR-2-receptor niet alleen het verstoren van de E-cadherine-cel-celcontacten teweeg kan brengen via een intracellulaire route, maar ook de aanmaak van pro-inflammatoire cytokinen stimuleert, waaronder IL-6, IL-8, ‘granyocyte-macrophage colony-stimulating factor’ (GM-CSF), chemokine-ligand 17 (CCL17), ‘thymic stromal lymphopoietin’ (TSLP) en CCL20.<sup>8,14-16</sup> De cytokinen CCL17 en TSLP zijn respectievelijk verantwoordelijk voor het aantrekken en differentiëren van de Th2-cellen, terwijl CCL20 het aantrekken van DC-cellen bevordert.<sup>17-19</sup> CCL20 is verder een interessant chemokine, omdat is aangetoond dat CCL20 verhoogd wordt afgegeven na allergeenprovocatie bij astmapatiënten en mogelijk een belangrijke rol speelt bij de ontstekingsreactie in de luchtwegen van astmapatiënten.<sup>20,21</sup> Bovendien zijn de CCL20-spiegels verhoogd bij ernstig astma vergeleken met niet-ernstig astma en na inademing van het allergeen.<sup>22</sup> Huisstofmijt bevat ook componenten die niet enzymatisch zijn, zoals  $\beta$ -glucanstructuren, die een

andere PRR genaamd *dectin-1*, kunnen activeren, en waarvan bekend is dat het de aanmaak van CCL20 door luchtwegepitheel stimuleert.<sup>9</sup> Verder bevat huisstofmijt endotoxines afkomstig van gramnegatieve bacteriën en Der p2, die beide de toll-like receptor (TLR)-4 in epitheel kunnen activeren en daarmee belangrijk zijn voor de ontwikkeling van allergisch astma in een muismodel.<sup>10,23,24</sup> Daarnaast bevat huisstofmijt andere enzymatische stoffen zoals chitinase, die de mijt bij zich draagt voor de opbouw en afbraak van zijn chitineskelet. Van chitinase is gebleken dat het de aanmaak van verschillende cytokinen, waaronder CCL17, in longepitheel stimuleert.<sup>25</sup> Huisstofmijt bevat dus verschillende componenten die op meerdere manieren het luchtwegepitheel kunnen beschadigen en/of activeren.

### Eigenschappen van huisstofmijt die belangrijk zijn voor het effect op luchtwegepitheel en allergische sensibilisatie in vivo

Omdat er nog weinig bekend is over de directe reactie van luchtwegepitheel op huisstofmijt en daarmee samenhangende sensibilisatie voor huisstofmijt, hebben wij onlangs het effect van verschillende huisstofmijtexttracten afkomstig van Greer, Citeq en ALK vergeleken op humane bronchiale epitheelcellen in vitro en bij de muis in vivo. Daarbij hebben wij de effecten van huisstofmijtexttract op barrièrefunctie



**Figuur 2. Effecten van huisstofmijt op luchtwegepitheel.** De 'tight junctions' (TJ) en 'adherens junctions' (AJ) zijn belangrijke cel-celcontacteiwitten voor barrièrefunctie van het luchtwegepitheel. Huisstofmijt beschadigt het epitheel en verstoort de integriteit van AJ's en TJ's, waardoor de barrièrefunctie vermindert en huisstofmijt gemakkelijker de dendritische cellen (DC's) in de submucosa kan bereiken. Daarnaast kunnen verschillende receptoren (waaronder 'protease activated receptor' (PAR)-2, toll-likereceptor (TLR)-4 en Dectin-1 op het epitheel verschillende componenten van de huisstofmijt herkennen, wat niet alleen leidt tot versterking van de TJ's/AJ's maar ook de productie van pro-inflammatoire cytokines, zoals 'granulocyte-macrophage colony-stimulating' factor (GM-CSF), 'thymic stromal lymphopoietin' (TSLP), chemokineligand 17 (CCL17) en CCL20, veroorzaakt. Al deze effecten van huisstofmijt leiden uiteindelijk tot een TH2-gemedieerde luchtwegontsteking en allergische sensibilisatie.

en cytokineproductie van epitheel in vitro en het vermogen om kenmerken van allergisch astma te induceren bij de muis onderzocht. Hierbij werden luchtwegontsteking, pro-inflammatoire cytokineproductie, mestceldegranulatie, verhoogde IgE-spiegels en luchtweghyperreactiviteit voor metacholine bepaald. De samenstelling en biochemische activiteiten van de huisstofmijtextracten bleken sterk te verschillen, voornamelijk wat betreft de serineproteaseactiviteit, chitinaseactiviteit en endotoxinespiegels

(Tabel 1).<sup>26</sup> Zo had het extract van Citeq de sterkste serineprotease- en het extract van Greer de minste serineproteaseactiviteiten. Bovendien was de totale proteaseactiviteit in het Greerextract nog steeds actief na hittebehandeling, wat aangeeft dat het Greerextract hitteongevoelige proteasen bevat die verschillen van serine- en cysteineproteasen (Tabel 1). Eveneens vonden we dat de aanwezigheid van chitinase-enzymen, waarvan de activiteit werd geremd door verhitting, verschillend was tussen de huisstofmijtextracten.

Daarnaast liepen endotoxinespiegels zeer uiteen in de extracten, met de hoogste spiegels in het Citeqextract (*Tabel 1*). Verrassend genoeg zagen we dat het extract met de laagste serineproteaseactiviteit het sterkst de barrièrefunctie van het luchtweg-epitheel in vitro verminderde. Ondanks de beperkte serineproteaseactiviteit bleek dit extract belangrijke cel-celcontactiwitten zoals occludine af te breken en verlies van E-cadherine in cel-celcontacten te verminderen. Tevens veroorzaakte dit extract de sterkste aanmaak van pro-inflammatoire cytokinen, waaronder CCL20, in het luchtweg-epitheel in vitro. Geheel onverwacht bleken deze effecten niet te remmen door hittebehandeling van het extract, wat aangeeft dat zowel serine- en cysteineproteasen als chitinases niet essentieel zijn voor het verminderen van de barrièrefunctie en CCL20-productie. Wel vonden we dat er in het extract ook onbekende hittebestendige proteasen aanwezig zijn, die wellicht betrokken zouden kunnen zijn bij de effecten op het luchtweg-epitheel. In het muismodel zagen we ook dat het extract met de lage serineproteaseactiviteit voor verlies van E-cadherine in de celmembraan van het luchtweg-epitheel zorgde. Een belangrijke observatie was verder dat hetzelfde extract zorgde voor allergische sensibilisatie (IgE en huidtest) en de ontwikkeling van astma-merken zoals luchtweghyperreactiviteit, ontwikkeling van slijm en slijmbekercelhyperplasie, allergisch ontstekingsinfiltraat in de longen en een toename van CCL20 en CCL17.<sup>26</sup> De andere huisstofmijtextracten bewerkstelligden deze effecten niet of in mindere mate. Behalve de serineprotease- en chitinaseactiviteit, bleken ook de endotoxinespiegels niet van doorslaggevend belang voor de ontwikkeling van de pro-inflammatoire respons op het huisstofmijtextract in vivo. Op basis van deze resultaten kunnen we concluderen dat het vermogen van huisstofmijt om in het epitheel de barrièrefunctie te verminderen en de aanmaak van pro-inflammatoire cytokinen te bevorderen, is gerelateerd aan de allergische sensibilisatie en ontwikkeling van astma-merken in vivo. De reactie van het epitheel op huisstofmijt met betrekking tot barrièrefunctie en pro-inflammatoire cytokineproductie is dus mogelijk doorslaggevend voor de ontwikkeling en verergering van astma.

We mogen concluderen dat huisstofmijt de epitheliale barrière doorbreekt op een serineproteaseonafhankelijke manier (*Figuur 2*, pagina 14), en wij vermoeden

dat andere componenten en/of nog onbekende proteasen in het huisstofmijtextract ook de PAR-2-receptor kunnen activeren en daarmee een effect op E-cadherine kunnen uitoefenen, en gelijktijdig ook de productie van belangrijke pro-inflammatoire cytokinen zoals CCL20 en CCL17 veroorzaken (*Figuur 2*).<sup>14</sup> Verder kan ook het activeren van de dectin-1-receptor door de niet-enzymatische component  $\beta$ -glucan, en ook Der p2 dat de TLR-4-receptor kan activeren, een rol spelen in de cytokineproductie (*Figuur 2*).<sup>9</sup> Wij veronderstellen dat uiteindelijk de combinatie van de directe effecten van huisstofmijt op de barrière van het luchtweg-epitheel en het activeren van verschillende PRR's bijdraagt aan de aanmaak van factoren die TH2-cellen aantrekken en DC's aanstuurt tot een TH2-reactie, en dus cruciaal zijn voor de allergische sensibilisatie en progressie naar astma (*Figuur 2*). Wij verwachten dat andere allergenen mogelijk soortgelijke effecten kunnen bewerkstelligen. Van een aantal allergenen, waaronder kakkerlak, is bekend dat ze ook proteolytische activiteit bevatten en op de PAR-2-receptor kunnen aangrijpen.<sup>27</sup>

Vanuit onze resultaten blijkt dat het effect van huisstofmijt op de functie van E-cadherine in belangrijke mate is gerelateerd aan allergische sensibilisatie en astma, en E-cadherine hier mogelijk een cruciale rol speelt. Om dit te onderzoeken zijn wij momenteel bezig met de ontwikkeling van een conditionele E-cadherine-knock-outmuis waarmee op een genetische manier in alle luchtweg-epitheelcellen de expressie van E-cadherine kan worden uitgeschakeld. Met deze muizen kunnen we dan onomstotelijk aantonen of E-cadherineverlies een kritieke stap is in de ontwikkeling en/of verergering van allergisch astma na allergeeninhalatie

## Huisstofmijt en de astmatische patiënt

Het wordt steeds duidelijker dat het luchtweg-epitheel een cruciale rol speelt bij het ontwikkelen van allergisch astma. Onderzoek naar het luchtweg-epitheel bij de astmatische patiënt heeft aangetoond dat er kenmerken zijn van schade, zoals het loslaten van trilhaarepitheel en vermindering van E-cadherine-expressie.<sup>4</sup> Hoewel het nog steeds niet helemaal duidelijk is of de veranderingen in het epitheel bij astmapatiënten oorzaak of gevolg zijn van de ziekte,

## Aanwijzingen voor de praktijk

1. Het luchtwegepitheel en de schade die huisstofmijt hieraan toebrengt, spelen een cruciale rol bij het ontwikkelen van allergisch astma.
2. Het vermogen van huisstofmijt om de barrièrefunctie van het epitheel te verminderen en de aanmaak van pro-inflammatoire cytokinen te bevorderen, is niet gerelateerd aan de aanwezigheid van serine- en cysteineproteasen.
3. Het beschadigende effect van huisstofmijt, onder meer door het verminderen van de functie van E-cadherine, is in belangrijke mate gerelateerd aan allergische sensibilisatie en astma.

is gevonden dat deze veranderingen al heel vroeg optreden bij kinderen met astma, vaak al voordat de diagnose wordt gesteld.<sup>7</sup> Bovendien blijkt dat de meeste gevoeligheidsgenen voor astma tot expressie komen in het epitheel. Deze genen zouden ertoe kunnen bijdragen dat het luchtwegepitheel van astmapatiënten gevoeliger is voor schade door allergenen ofwel een verminderd vermogen heeft om te herstellen na beschadiging. Uit nieuw voorwerk weten we dat astma-epitheel inderdaad sterker reageert op huisstofmijtextract dan epitheel van gezonde controlepersonen, dat wil zeggen met betrekking tot het verlies van barrièrefunctie en de aanmaak van pro-inflammatoire cytokinen. Daarom is het van belang meer onderzoek te doen naar de onderliggende mechanismen die betrokken zijn bij de reactie van het luchtwegepitheel op huisstofmijt. Ons verdere onderzoek naar de effecten van E-cadherineverlies in het luchtwegepitheel, de gevolgen hiervan voor de ontwikkeling van allergisch astma en de daarbij betrokken mechanismen, zal hopelijk leiden tot nieuwe inzichten in de ontwikkeling van een therapie tegen astma.

### Conclusies

Uit ons recente onderzoek is gebleken dat de verminderde barrièrefunctie van het luchtwegepitheel na huisstofmijtblootstelling gerelateerd is aan allergische sensibilisatie, waarbij serine- en cysteineproteasen geen belangrijke rol spelen. Daarentegen blijkt dat de effecten van huisstofmijt op E-cadherineverlies in het luchtwegepitheel en de gevolgen hiervan een belangrijke rol kunnen spelen in toekomstige behandelingsstrategieën van allergisch astma.

### Referenties

1. Goto Y, Uchida Y, Nomura A, et al. Dislocation of E-cadherin in the airway epithelium during an antigen-induced asthmatic response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:712-8.
2. Holgate ST. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 2011;242:205-19.
3. Nawijn MC, Hackett TL, Postma DS, et al. E-cadherin: gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization. *Trends Immunol* 2011;32:248-55.
4. Boer WI de, Sharma HS, Baelemans SM, et al. Altered expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: possible role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 2008;86:105-12.
5. Koppelman GH, Meyers DA, Howard TD, et al. Identification of PCDH1 as a novel susceptibility gene for bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:929-35.
6. Ierodiakonou D, Postma DS, Koppelman GH, et al. E-cadherin gene polymorphisms in asthma patients using inhaled corticosteroids. *Eur Respir J* 2011;38:1044-52.
7. Barbato A, Turato G, Baraldo S, et al. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:975-81.
8. Rohani MG, Beyer RP, Hacker BM, et al. Modulation of expression of innate immunity markers CXCL5/ENA-78 and CCL20/MIP3alpha by protease-activated receptors (PARs) in human gingival epithelial cells. *Innate Immunol* 2010;16:104-14.
9. Nathan AT, Peterson EA, Chakir J, et al. Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:612-8.
10. Hammad H, Chieppa M, Perros F, et al. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 2009;15:410-6.

11. Lambrecht BN and Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 2012;18:684-92.
12. Wan H, Winton HL, Soeller C, et al. The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of *Dermaphagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 2001;31:279-94.
13. Ebeling C, Lam T, Gordon JR, et al. Proteinase-activated receptor-2 promotes allergic sensitization to an inhaled antigen through a TNF-mediated pathway. *J Immunol* 2007;179:2910-7.
14. Winter MC, Shasby SS, Ries DR, et al. PAR2 activation interrupts E-cadherin adhesion and compromises the airway epithelial barrier: protective effect of beta-agonists. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L628-35.
15. Asokanathan N, Graham PT, Stewart DJ, et al. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J Immunol* 2002;169:4572-8.
16. Kauffman HF, Tamm M, Timmerman JA, et al. House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin Mol Allergy* 2006;4:5.
17. Heijink IH, Kies PM, Kauffman HF, et al. Down-regulation of E-cadherin in human bronchial epithelial cells leads to epidermal growth factor receptor-dependent Th2 cell-promoting activity. *J Immunol* 2007;178:7678-85.
18. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* 2005;174:8183-90.
19. Pichavant M, Charbonnier AS, Taront S, et al. Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:771-8.
20. Francis JN, Sabroe I, Lloyd CM, et al. Elevated CCR6+ CD4+ T lymphocytes in tissue compared with blood and induction of CCL20 during the asthmatic late response. *Clin Exp Immunol* 2008;152:440-7.
21. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 2001;1:108-16.
22. Hastie AT, Moore WC, Meyers DA, et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:1028-36.
23. Valerio CR, Murray P, Arlian LG, et al. Bacterial 16S ribosomal DNA in house dust mite cultures. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1296-300.
24. Trompette A, Divanovic S, Visintin A, et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 2009;457:585-8.
25. Hartl D, He CH, Koller B, et al. Acidic mammalian chitinase is secreted via an ADAM17/epidermal growth factor receptor-dependent pathway and stimulates chemokine production by pulmonary epithelial cells. *J Biol Chem* 2008;283:33472-82.
26. Post S, Nawijn MC, Hackett TL, et al. The composition of house dust mite is critical for mucosal barrier dysfunction and allergic sensitisation. *Thorax* 2012;67:488-95.
27. Page K, Ledford JR, Zhou P, et al. Mucosal sensitization to German cockroach involves protease-activated receptor-2. *Respir Res* 2010;11:62.

Ontvangen 16 augustus 2012, geaccepteerd 5 november 2012.

## Rectificatie

In het artikel van Rijssenbeek-Nouwens en Bel (NTvAA 2012;4:163-71) staat referentie 15 niet correct vermeld. De juiste vermelding is:

15. Grootendorst DC, Dahlén SE, Van Den Bos JW, et al. Benefits of high altitude allergen avoidance in atopic adolescents with moderate to severe asthma, over and above treatment with high dose inhaled steroids. *Clin Exp Allergy* 2001;31:400-8.