



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Development of human skin equivalents to unravel the impaired skin barrier in atopic dermatitis skin

Eweje, M.O.

Citation

Eweje, M. O. (2016, September 1). *Development of human skin equivalents to unravel the impaired skin barrier in atopic dermatitis skin*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/42540>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/42540>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/42540> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Danso-Eweje, M.O.

Title: Development of human skin equivalents to unravel the impaired skin barrier in atopic dermatitis skin

Issue Date: 2016-09-01

CHAPTER 8

Nederlandse samenvatting

In constitutioneel eczeem (Atopic Dermatitis, AD) is de huidbarrière aangetast in zowel aangedane als niet-aangedane huid. Een defecte barrière wordt gekenmerkt door verhoogd trans-epidermaal waterverlies (TEWV), verhoogde permeabiliteit en verminderde hydratatie van de buitenste laag van de huid, de hoornlaag, welke de barrière vormt (1-4). De hoornlaag bestaat uit een gelaagde structuur van afgeplatte corneocyten omringd door een intercellulaire lipidematrix. Deze lipiden vormen het grensvlak tussen de hydrofiele corneocyten en de hydrofobe lipidematrix.

De structuur van de hoornlaag wordt vaak vergeleken met de structuur van een stenen muur, waarbij de corneocyten de bakstenen zijn en de lipiden het cement (5). De lipidematrix bestaat voornamelijk uit ceramiden (CERs), cholesterol (CHOL) en vrije vetzuren (FFAs), welke in equimolaire ratios aanwezig zijn (6-8). Verreweg de meeste stoffen komen via de lipidematrix de hoornlaag binnen; vandaar dat de organisatie en samenstelling van deze matrix cruciaal is voor de barrierefunctie (9-10). De lipiden in de hoornlaag zijn georganiseerd als lamellen, in een repeterend patroon met een interval van afwisselend 13 en 6 nm tussenruimte. Deze worden respectievelijk de lange periodieke fase (long periodicity phase, LPP) en de korte periodieke fase (short periodicity phase, SPP) genoemd (11-13). Binnen deze lamellen vormen de lipiden een geordende structuur: de zogenoemde laterale organisatie. In de menselijke hoornlaag zijn de lipiden voornamelijk in een orthorombische structuur (met hogere dichtheid) geordend, terwijl een klein deel van de lipiden een hexagonale ordening (met lagere dichtheid) vormen (14-18).

In de hoornlaag van AD patiënten zijn verschillende afwijkingen in de lipidenamenstelling gevonden. Deze afwijkingen zijn onder andere: verlaging van de CERs/CHOL verhouding, kortere lipidenketens, verhoogde hoeveelheid onverzadigde vrije vetzuren en een verlaagde hoeveelheid hydroxy-vetzuren. Een aantal van deze afwijkingen zijn gecorreleerd aan verhoogd TEWV (19-25). Dit bevestigt dat de lipiden belangrijk zijn voor de barrierefunctie van de huid.

AD is een complexe chronische recidiverende huidontstekingsziekte. Er zijn verschillende afwijkingen beschreven die allen een invloed hebben op de kans dat AD zich ontwikkelt en de ernst en mate waarin AD zich manifesteert. Voorbeelden zijn fillagrine- (FLG) genmutaties, verstoring van de huidbarrière, afwijken van de microbiële kolonisatie van de huid, en verhoogde activatie van ($T_H1/T_H2/T_H17/T_H22$) ontstekingsroutes (26-28). AD wordt ook geassocieerd met een verhoogd risico op andere allergische aandoeningen, zoals asthma, hooikoorts en voedselallergieën (29). Algemeen wordt aangenomen dat een combinatie van een verminderde huidbarrierefunctie en een verhoogde gevoeligheid van de huid voor ontstekingen (verhoogde immuunrespons) een significante rol kunnen spelen bij de ontwikkeling van AD (2,30,31).

De huid van AD patiënten typeert zich door een verhoogde aanwezigheid van cytokines zoals interleukine- (IL) 4, IL-5 en IL-13 (zogenoemde T_H2 cytokines). Zodra de ziekte chronisch wordt, vindt een verhoogde productie van cytokines zoals IL-12 en interferon (IFN)- γ plaats (zogenoemde T_H1 cytokines) (32). Cytokines hebben invloed op de enzymen die een rol spelen bij de biosynthese van de lipiden in de huid. Dit resulteert in een afwijkende lipidenamenstelling in de hoornlaag (33,34).

Muismodellen zijn dusver waardevol geweest om de mechanismes van AD-pathogenese te ontrafelen. Ondanks het feit dat deze modellen geschikt zijn voor het onderzoeken van de biochemische mechanismes is de vertaalslag naar AD in mensen lastig te maken, omdat de huidstructuur van muizen en mensen veel van elkaar verschillen (35, 36). Gekweekte humane huid, zoals humane huid equivalenten (HHEs), vormt een goed alternatief om AD-pathogenese te onderzoeken en mogelijke nieuwe therapeutische aangrijpingspunten te ontdekken.

Doel

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het reproduceerbaar ontwikkelen van HHEs die AD-kenmerken nabootsen. Vervolgens kan met deze HHEs het effect van een ontsteking op de karakteristieke eigenschappen van de huidbarrière onderzocht worden. Echter, om dit tot stand te brengen, is eerst de biosynthese van lipiden in aangedane en niet-aangedane huid van AD patiënten onderzocht.

In het onderzoek beschreven in dit proefschrift staan de volgende vragen centraal:

- 1) Bestaat er een verband tussen de expressie van een aantal geselecteerde enzymen die een rol spelen in de lipidenbiosynthese in de huid en de lipidenamenstelling in de hoorlaag van AD patiënten?
- 2) Speelt een ontsteking in de huid een rol bij de veranderingen in epidermale morfogenese, differentiatie en lipide-eigenschappen in aangedane AD-huid?
- 3) Kunnen de epidermale eigenschappen van AD huid behouden blijven in *in vitro* AD-HHEs, gemaakt op basis van AD huid biopoten?
- 4) Is het mogelijk om een HHE voor barrièreherstel te ontwikkelen dat verschillende aspecten van de barrière van AD-huid nabootst?

Ontsteking, enzymexpressie van de lipidebiosynthese en de SC lipide-eigenschappen in AD

Door gebruik te maken van HHEs is het mogelijk om effecten van ontstekingscytokines te onderzoeken op de huidbarrierefunctie (37-40). Dit is van belang omdat het nog niet bekend is welke invloed verhoogde concentraties chemokines en cytokines hebben op i) de lipidenbiosynthese in de huid en ii) de samenstelling en organisatie van de lipiden in het SC. De veranderingen in de lipidenamenstelling komen waarschijnlijk door een verandering in expressie of activiteit van één of meerdere van deze enzymen. We focuseren ons hierbij voornamelijk op de enzymen β -glucocerebrosidase (GBA), acid-sphingomyelinase (aSmase), CER synthase 3 (CerS3), stearyl-CoA desaturase (SCD), Elongase1 (ELOVL1) en Elongase6 (ELOVL6).

GBA en aSmase katalyseren de laatste stap in de CER-synthese van respectievelijk glucosylceramides en sphingomyelines naar ceramides. ELOVL1 verlengt vrije vetzuren met een koolstofketen van C20 tot C26, ELOVL4 verlengt de vrije vetzuren die langer zijn dan C26 (42-45). CerS3 koppelt de zeer lange FFA ketens (langer dan C26) aan een sphingosinebase tijdens de synthese van de CERs (34). Daarnaast is ELOVL6 verantwoordelijk voor de verlenging van vetzuren met een koolstofketen van C16 en C18. SCD zorgt dat verzadigde vetzuren met een ketenlengte van 16 en 18 C atomen omgezet worden in onverzadigde vetzuren(46).

In de studies beschreven in **hoofdstuk 2** is onderzocht of er een verandering is in de expressie van de enzymen SCD, ELOVL1, ELOVL6, CerS3, GBA en aSmase alsmede een verandering in lipidenamenstelling in aangedane en niet-aangedane huid van AD patiënten. De expressie van deze enzymen en de lipidenamenstelling in AD patiënten is vergeleken met een controlegroep. De SCD-expressie is verhoogd in de aan-

gedane huid en dit gaat gepaard met een significante verhoging van de hoeveelheid mono-onverzadigde vrije vetzuren. De expressie van een tweede enzym, ELOVL1, is verlaagd vergeleken met die in de controle huid en niet-aangedane huid. In dezelfde patiënten werd een reductie in de hoeveelheden vrije vetzuren met een C22- tot C28-koolstofketen waargenomen. Een vergelijkbare waarneming is gedaan voor de ultra-lange vrije vetzuren (ketenlengte groter dan 26 koolstofatomen). Deze vetzuren worden verlengd door ELOVL4; de hoeveelheid ultra-lange FFAs was significant gereduceerd in door AD aangedane huid vergeleken met de controle huid. Er was geen verschil in de expressie van ELOVL6 tussen de AD en controle huid.

De resultaten beschreven in **hoofdstuk 2** samen met eerder gepubliceerde studies geven een goed inzicht in enzymatische en lipiden afwijkingen in huid van AD patiënten. In de in **hoofdstuk 3** beschreven studies zijn, met behulp van het Leiden epidermale model (LEM), de directe effecten van de verhoogde cytokines, een aspect van huid inflammatie, op de epidermale morfogenese, differentiatie en SC lipidsamenstelling onderzocht. Uit deze studies blijkt dat cytokines (TNF- α , IL-4, IL-13 en IL-31), waarvan de concentraties in de epidermis verhoogd zijn in aangedane huid van AD patiënten, de epidermale morfogenese, differentiatie en SC lipidsamenstelling beïnvloeden. TNF- α en T_H2 cytokines reduceren de expressie van keratine 10 (K10), fillagrine en loricrine in de LEMs. Deze cytokines hebben tevens effect op thymisch stromaal lymphopoietine (TSLP) secretie door keratinocyten, welke hierdoor een verhoogde proliferatie hebben. Uit de analyses van de lipidsamenstelling blijkt dat TNF- α , met of zonder T_H2 cytokines, de expressie van ELOVL1 en de hoeveelheid verzadigde lange FFAs ($\geq$ C20:0) verlaagt.

Toevoeging van IL-31 en TNF- α aan het medium beïnvloedt ook de ceramide synthese. De verhouding van veresterde ω -hydroxy (EO) CERs (ceramides met zeer lange vetzuurketens, waaraan een linoleate veresterd is) ten opzichte van niet-EO ceramides (de ceramides met een normale structuur) is verlaagd. De verlaagde expressie van Cer53 zal waarschijnlijk bijdragen aan deze verlaagde verhouding. Cer53 is een enzym dat in staat is deze EO CERs te synthetiseren. De verandering in de CER-samenstellingen ging gepaard met een kortere repetitieafstand van LPP. Deze afstand is korter in HHEs gegenereerd met T_H2 cytokines in het medium. Uit de studies beschreven in **hoofdstuk 2** kan geconcludeerd worden dat i) ontsteking de oorzaak kan zijn van belangrijke afwijkingen in aangedane huid van AD patiënten, en ii) de toevoeging van cytokines aan de LEMs een uitstekend model is voor het testen van nieuwe medicatie of formuleringen voor de behandeling van AD.

***In vitro* AD model door middel van gebruik van AD-huid explantaten**

AD-huid bipten kunnen gebruikt worden als een alternatieve manier om AD-HHEs te genereren; als alternatief voor HHEs gegenereerd uit geïsoleerde primaire keratinocyten. Dit onderzoek is beschreven in **hoofdstuk 3**. Voor deze techniek wordt gebruik gemaakt van bipten met een diameter van 4 mm. Dit biopt wordt aangebracht op een collageenmatrix met fibroblasten (dit compartiment kan vergeleken worden met de dermis). In kweek zal deze epidermis lateraal uitgroeien. Dit vormt dan de 1^e generatie van explant humane huid equivalent (Ex-HHEs). Deze techniek kan gebruikt worden voor analyses waarvoor meer weefsel nodig is dan normaliter uit patiëntenmateriaal verkregen wordt, zoals voor eiwitbepalingen, of voor onderzoek naar eigenschappen van de lipidenmatrix in de hoornlaag. Deze techniek kan uitkomst

bieden om de afname van weefsel van patiënten met huidziektes voor onderzoek te minimaliseren. De 1^e generatie explant kan gebruikt worden om vervolgens 2^e en een 3^e generatie Ex-HHEs te maken. De 2^e generatie kan worden gemaakt door een biopt van de 1^e generatie op een nieuw dermaal compartiment te plaatsen. Dezelfde aanpak wordt gebruikt voor het maken van de 3^e generatie Ex-HSE.

De resultaten van **hoofdstuk 4** laten zien dat de morfologie van de 2^e en 3^e generatie Ex-HSEs vergelijkbaar is met die van de 1^e generatie. Echter, sommige lipideeigenschappen verschillen, vooral wanneer de 1^e Ex-HHEs vergeleken wordt met natieve huid. Ook de expressie van differentiatie markers, K10, loricrine en fillagrine, is vergelijkbaar met die van de natieve huid en de 1^e generatie Ex-HHEs. In zekere mate, zijn ook de lipideeigenschappen van de 2^e en 3^e generatie Ex-HSEs vergelijkbaar met die van de 1^e generatie Ex-HHE en natieve huid. De belangrijkste verschillen zijn een verhoogde hoeveelheid korte vetzuren, de hexagonale laterale structuur en een verhoging van de EOS CERs. De uitgroei van de huidbiopten naar de 2^e generatie en 3^e generatie Ex-HSEs kan een veelbelovende methode zijn voor het genereren van waardevol materiaal, echter voor het bestuderen van lipideeigenschappen hebben Ex-HHEs beperkingen.

De hierboven beschreven techniek is ook gebruikt voor het genereren van Ex-HHEs met biopten afkomstig van niet-aangedane huid van AD-patiënten, met en zonder homozygotische FLG-mutatie. Deze AD Ex-HSEs zijn onderzocht om te bepalen of de epidermale eigenschappen van AD-patiënten nog aanwezig zijn en tevens om te bepalen of FLG mutaties een rol spelen in epidermale morfogenese. De resultaten beschreven in **hoofdstuk 5** tonen aan dat de expressie van de epidermale differentiatie-eiwitten (fillagrine, involucrine, kallikrein 5 en LEKTI) in de Ex-HHEs van AD-biopten onveranderd is. Hoewel ook de loricrine-expressie in Ex-HSEs onveranderd was, bleek deze verlaagd te zijn in zowel AD biopten met een homozygotische FLG mutatie als ook de corresponderende Ex-HSEs. Deze studie laat zien dat de *in vivo* FLG mutatie-eigenschappen in het genotype en fenotype behouden blijven in het *in vitro* model, de Ex-HHEs. Deze kennis kan bijdragen aan de ontwikkeling van een weefselsmodel om de rol van FLG in AD of FLG-hersteltherapieën te onderzoeken. Zo'n model zou waardevol zijn om mogelijke nieuwe therapieën, zoals FLG-vervanging, te testen en te evalueren.

Een *ex vivo* model voor barrièreherstel van de huid

Momenteel zijn er geen geschikte *in vitro* modellen beschikbaar voor het onderzoeken van huidbarrièreherstel geïnduceerd door topicaal opgebrachte farmaceutisch en/of formuleringen. In het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 6** wordt een humaan *ex vivo* huidmodel geïntroduceerd dat gebruikt kan worden om huidbarrièreherstel te meten. Door middel van cyanoacrylaat strips wordt het SC van de *ex vivo* humane huid verwijderd. Vervolgens wordt de gestripte huid in kweek gebracht bij 37°C en 32°C. Na 8 dagen kweken kan de morfologie van de epidermis, de expressie van differentiatie markers alsmede de lipidensamenstelling en organisatie in het SC worden onderzocht. Uit de resultaten is gebleken dat de gestripte huid een actief prolifererende en differentiërende epidermis heeft, wat resulteert in het genereren van het SC *in vitro*. De lipiden in het geregenereerde SC vormen voornamelijk een hexagonale laterale packing. Dit is afwijkend van de dominante orthorhombische packing in natieve humaan SC. De absolute hoeveelheid van CERs in het *in vitro* geregenereerde SC zijn ook verhoogd ten opzichte van de andere lipiden. De absolute

hoeveelheid CERs NS en CER AS/NH is ook verhoogd in het *in vitro* geregenereerde SC gekweekt bij of 37°C of 32°C. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de bovengenoemde karakteristieken van SC lipiden van de gestripte en gekweekte huid de lipidsamenstelling van huid van AD betreffende een aantal aspecten nabootsen (23, 24, 47). Daarom kan dit model mogelijk in de toekomst gebruikt worden om formuleringen te testen die als doel hebben het barrièreherstel te versnellen.