



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Human skin equivalents to study the prevention and treatment of wound infections

Haisma, E.M.

Citation

Haisma, E. M. (2018, March 28). *Human skin equivalents to study the prevention and treatment of wound infections*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/61135>

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/1887/61135>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/61135> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Haisma, Ilse

Title: Human skin equivalents to study the prevention and treatment of wound infections

Date: 2018-03-28

CHAPTER 9

Nederlandse samenvatting (Dutch Summary)

Curriculum Vitae

List of publications

Nederlandse Samenvatting

Bacteriële infecties vormen één van de vaakst voorkomende complicaties bij de genezing van (brand-) wonden. Dit soort infecties kunnen niet altijd effectief behandeld worden met antibiotica vanwege de ontwikkeling van resistentie en/of de aanwezigheid van een biofilm. Een biofilm is een “film” van bacteriën die zijn vastgehecht aan een oppervlak en zichzelf hebben omgeven met een beschermende suikerlaag. Deze laag wordt ook wel extracellulaire matrix (ECM) genoemd. Bacteriën in een biofilm kunnen 10 tot 1000 keer minder gevoelig zijn voor antibiotica dan als ze zich niet in een biofilm bevinden. Dit heeft verscheidene redenen; ten eerste kunnen antibiotica niet goed door de ECM heen dringen, waardoor de concentratie werkzame stof binnenin de biofilm te laag is om de bacteriën te doden. Ook kunnen de bacteriën in een biofilm zich in een “latente” staat verkeren, dit betekent dat ze niet delen. Hierdoor kan de antibiotica zijn werk niet doen. Naast de bescherming van de biofilm kan het ook zijn dat bacteriën resistent zijn tegen antibiotica. De laatste jaren komen antibioticaresistente bacteriën (die wonden koloniseren) steeds vaker voor. De WHO (World Health Organization) vraagt recent dan ook steeds meer aandacht voor het (goed) gebruik van antibiotica om de opkomst van antibioticaresistentie e.e.a. halt toe te roepen. Om deze redenen wordt het zoeken naar nieuwe antimicrobiële middelen steeds noodzakelijker.

Een van de potentiële kandidaten hiervoor zouden antimicrobiële peptiden (AMP's) kunnen zijn. AMP's zijn korte eiwitten die voorkomen in het lichaam met, zoals de naam al zegt, een antimicrobiële werking. Behalve antimicrobiële eigenschappen hebben deze peptiden vaak ook nog andere functies, waardoor ze ook wel humane defensie eiwitten genoemd worden. Het humane AMP LL-37 (afgesplitst van het eiwit cathelicidine) heeft een breed antimicrobiële werking tegen verscheiden micro-organismen zoals *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* en *Escherichia coli*. Naast een antimicrobiële werking heeft LL-37 ook een rol in de wondgenezing, het neutraliseren van toxines uitgescheiden door pathogenen en het aantrekken van immuuncellen. AMP's komen op veel plaatsen in het lichaam voor; bijvoorbeeld in de longen en op de huid waar het lichaam veel wordt blootgesteld aan pathogenen is de lokale concentratie hoog. Sommige AMP's, zoals LL-37, worden geïnduceerd door de aanwezigheid van pathogenen. Andere AMP's worden altijd in het lichaam uitgescheiden.

Dit Proefschrift

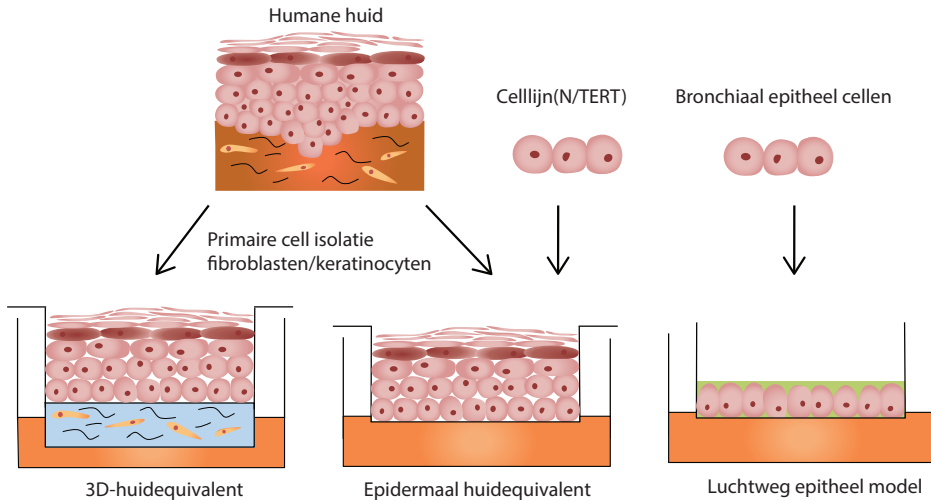
Het doel van het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift was ten eerste om een *in vitro* model te ontwikkelen voor (brand) wondinfecties en modellen voor kolonisatie. Hierbij kan gedacht worden aan huidequivalenten die thermisch

verwond worden, worden gekoloniseerd met bacteriën, een huidequivalent voor atopisch eczeem of een bronchiaal luchtweg epitheel. Het tweede doel was deze modellen te gebruiken om nieuwe strategieën te testen voor de eradicatie van bacteriën van de huid. Hiervoor werd gebruik gemaakt van synthetische AMP's gebaseerd op P60.4Ac, een peptide dat was afgeleid van de aminozuur sequentie van het humane peptide, LL-37.

Ontwikkeling huidmodellen

Huidequivalenten zijn stukjes gekweekte huid die voor onderzoeksdoeleinden in het laboratorium gebruikt kunnen worden. Daarnaast kunnen huidequivalenten gebruikt worden als transplantaat op bijvoorbeeld verbrande huid. In tegenstelling tot de algemeen gebruikte 2-dimensionale kweken in petrischalen zijn huidequivalenten 3-dimensionaal. Ook worden voor huidequivalenten vaak "primaire" cellen gebruikt in plaats van cellijnen. Deze cellen komen vaak van huid overbleven na operaties, bijvoorbeeld buikwandcorrecties. Hierdoor zijn huidequivalenten meer vergelijkbaar met de "normale" humane huid dan 2-dimensionale kweken. Huidequivalenten kunnen bestaan uit zowel een epidermis (opperhuid) als dermis (lederhuid). De dermis component in modellen gebruikt in dit proefschrift bestaan uit een collageen laag waar fibroblasten, de cellen die de extracellulaire matrix van de dermis produceren, zich in bevinden. De epidermis bestaat uit keratinocyten (huidcellen) deze zijn gedifferentieerd, en vormen ook het *stratum corneum*, de hoornlaag. Om de echte huid zoveel mogelijk te representeren worden de modellen aan de lucht gekweekt. In tegenstelling tot echte huid bevatten huidequivalenten geen immuuncellen zoals Langerhans cellen, ook zijn er geen bloedvaatjes, haartjes of zweetklieren aanwezig.

Voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gebruik gemaakt van vier verschillende modellen (**figuur 1**): (1) Een huidequivalent bestaande uit zowel dermis als epidermis; (2) een epidermaal huidmodel bestaande uit primaire cellen; (3) een epidermaal huidmodel bestaande uit een cellijn (N/TERT); en (4) een luchtweg epitheel model gemaakt van primaire bronchiaal epitheel cellen.



Figuur 1: Modellen gebruikt in dit proefschrift. In dit proefschrift is gebruik gemaakt van een aantal verschillende modellen: Het 3-D huidequivalent gemaakt van een dermis en epidermis component; het epidermale huidequivalenten bestaande uit primaire cellen uit humane huid of uit N/TERT cellen; en ten slotte het luchtweg epitheel model gemaakt van bronchiaal epitheel cellen.

Hoofdstukken

In **hoofdstuk 2** is een *in vitro* infectiemodel gemaakt door humane huidequivalenten te verwonden met vloeibare stikstof en vervolgens te infecteren met methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Vervolgens werd er gekeken naar het effect van deze infectie en een infectie van niet-verwonde huidequivalenten. Zowel inflammatie mediators, IL-6 en IL-8, als AMP's, hBD-2 en hBD-3 werden geïnduceerd in de niet-verwonde en verwonde huidequivalenten na infectie met MRSA. Op dit model kon topicaal aangebrachte mupirocine resistente MRSA eradiceren. In **hoofdstuk 3** is dit infectiemodel gebruikt om de antimicrobiële effectiviteit van synthetische peptiden afgeleid van LL-37 tegen verschillende (resistente) *S. Aureus* stammen te testen. Na een *in vitro* screen met peptiden gebaseerd op P60.4Ac op delende bacteriën werd het peptide P10 geselecteerd. P10 bleek, net als P60.4Ac, niet alleen efficiënt het aantal delende bacteriën in een suspensie te verminderen, maar ook te werken tegen *S. aureus* in biofilms. De biofilm massa en aantal levende bacteriën in de biofilm werd aanzienlijk vermindert na behandeling met P60.4Ac of P10. De behandeling van gekoloniseerde huidequivalenten met P60.4Ac en P10 resulteerde in de eliminatie van zowel MRSA als mupirocine-resistente MRSA. Ook bleken de nieuwe AMP's actief te zijn tegen verscheidene andere (pan-drug) resistente bacteriën, waaronder *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* en *Acinetobacter baumannii* (**hoofdstuk 4**). Niet

alleen P10 was hiermee effectief maar ook een nieuwe generatie synthetische peptiden, P145, P148 en 276. Deze peptiden waren ook efficiënt in het eradiceren van pan-drug resistente *P. aeruginosa* van verwonde huidequivalenten.

Om de peptiden beter te kunnen aanbrengen op de huid, is er in **hoofdstuk 5** een peptide-zalf ontwikkeld. Drie verschillende formuleringen werden getest als drager voor de peptiden: Softisan-649 (op water in olie basis), cetomacrogol (olie in water basis) en hypromellose gel (water basis). De formuleringen werden zowel op epidermale huidequivalenten als luchtweg epitheel modellen getest. Luchtweg epitheel modellen zijn gemaakt van bronchiaal epitheel cellen die aan de lucht gekweekt zijn. Hierdoor zijn ze uitgedifferentieerd en bezit dit model veel eigenschappen van luchtweg epitheel zoals het uitscheiden van mucus (Figuur 1). P10, dat werd geformuleerd in de hypromellose gel bleek het meest effectief te zijn in het eradiceren van MRSA van epidermale huidequivalenten, en van luchtweg epitheel modellen.

Kolonisatie met *S. aureus* komt ook veel voor bij patiënten met atopische dermatitis. Atopische dermatitis (of atopisch eczeem) is een immuun-gemedieerde ontsteking van de huid. Er wordt gedacht dat atopische dermatitis een grote erfelijke component heeft. Symptomen zijn roodheid, schilfering en jeuk. Opvallend is dat bijna alle patiënten gekoloniseerd zijn met *S. aureus* op de aangedane huid. Om de effectiviteit van de antimicrobiële zalfjes ontwikkeld in **hoofdstuk 5** te testen voor AD, is in **hoofdstuk 6** een epidermaal huidequivalent ontwikkeld voor atopische dermatitis. Dit model is gemaakt door een mutatie aan te brengen in de huidcellen. Deze mutatie leidt ertoe dat een eiwit, filaggrin, bijna niet meer gevormd wordt. Dit eiwit speelt een rol de vorming van de hoornlaag. Behalve deze mutatie werd er ook een extra ontstekingsfactor, IL-31, die vaak aanwezig is bij atopische dermatitis, toegevoegd. Deze huidequivalenten bleken na het toevoegen van IL-31 en/of het afwezig zijn van filaggrin gevoeliger te zijn voor kolonisatie met *S. aureus*. Ook waren andere eiwitten, die te maken hebben met de vorming van de hoornlaag verminderd aanwezig in deze modellen. In de toekomst zou dit huidequivalent voor atopisch eczeem ook gebruikt kunnen worden om de peptidezalf te testen.

Een andere strategie om nieuwe antimicrobiële middelen te ontwikkelen is het identificeren van een specifieke target die door de bacterie tot expressie wordt gebracht op de huid. In **hoofdstuk 7** is de productie van virulentie factoren, waaronder toxines, gemeten van vijf verschillende *S. aureus* stammen. Deze stammen werden ofwel op epidermale huidequivalenten gebracht of op plastic (polystyreen),

waar zij een biofilm vormden. Hierbij toonden de resultaten aan dat er verschillen zitten tussen virulentie factoren die tot uiting komen bij *S. aureus* op plastic of op de epidermale huidequivalenten. Vier toxines (alpha-toxin, gamma-hemolysin B and leukocidins D en E), twee immuun-modulerende eiwitten (formyl peptide receptor-like inhibitory protein and Staphylococcal superantigen-like protein 1), en twee overige eiwitten (lipase en lytM) werden wel gemeten bij de *S. aureus* gebonden aan epidermale huid modellen, maar niet bij *S. aureus* gebonden aan plastic. Deze factoren kunnen mogelijke targets zijn bij het ontwikkelen van nieuwe antimicrobiële strategieën.

Conclusie

Huidequivalenten, zoals ontwikkeld in dit proefschrift, kunnen een belangrijke rol spelen bij de ontdekking en ontwikkeling van nieuwe antimicrobiële middelen. Ten eerste omdat de huidmodellen beter de geïnfecteerde huid van de patiënt nabootsen dan bacteriën gekweekt in een petrischaal, die nu vaak worden gebruikt bij onderzoek naar nieuwe antibiotica. Ten tweede, is het belangrijk om nieuwe antimicrobiële middelen te testen op biofilm, aangezien een groot deel van de infecties biofilm-geassocieerd zijn. Op de huidequivalenten bevinden bacteriën zich vaker in een biofilm, terwijl bacteriën in suspensie, zoals meestal gebruikt in onderzoek, zich in de delende fase (ook wel log-fase genoemd) bevinden. Ten derde, omdat niet alleen de antimicrobiële effecten kunnen worden onderzocht maar ook bijvoorbeeld toxiciteit van de AMP's, effect op wondgenezing en initiatie van verdedigingsmechanismen van de gastheer. Ten slotte kunnen huidequivalenten gebruikt worden om de interactie tussen verschillende bacteriestammen en de huid te onderzoeken, en om de invloed van MRSA op verschillende ziektebeelden te onderzoeken (zoals atopische dermatitis). Alles bij elkaar genomen laten de resultaten van dit proefschrift het potentieel zien van het gebruik van synthetische AMP's lokaal toegepast op de huid.

Curriculum Vitae

Ilse (Elisabeth) Haisma was born in Nieuwegein, the Netherlands on the 3rd of May 1986. She completed her VWO in 2004. The same year she started studying Biomedical Sciences in Leiden. During her second year she continued her studies at the Karolinska Institute in Stockholm, Sweden, for 6 months to follow the courses Neuroscience, Pharmacology and Physiology. From August 2006 till August 2007 she was board member of the A.L.S.Z.V. de Blauwe Schuit, a student sailing association. In 2007 she started her Bachelor internship under the supervision of dr. L.A. Trouw at the Rheumatology department of the LUMC (Leids Universitair Medisch Centrum). At the LUMC she studied the activation of the complement system by citrullinated peptides present in the serum of patients suffering from rheumatoid arthritis. In 2008 she obtained her bachelor degree and started her Biomedical Sciences master in Leiden.

Her first master internship was combined at the Rheumatology departments of the LUMC and at the rheumatology department of McGill University, Montreal, Canada. Under the supervision of Prof. dr. R. Toes and dr. D. van der Woude Ilse studied the role of anti-citrullinated protein antibodies present in rheumatoid arthritis patients on disease severity. Her final master internship was at the departments of infectious diseases and dermatology at the LUMC under the supervision of dr. P.H. Nibbering and dr. A. El Ghalbzouri setting up a skin model for wound infections. After obtaining her master's degree in 2010, she continued this work as a PhD student at the same departments. In October 2014 she started as a scientist at ProQR therapeutics N.V. in Leiden. She currently works on novel RNA based therapeutics for the rare skin disorder dystrophic epidermolysis bullosa.

List of Publications

Trouw LA, **Haisma EM**, Levarht EW, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Daha MR, Huizinga TW, Toes RE. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum.* 2009 Jul;60(7):1923-31. doi: 10.1002/art.24622.

de Breij A, **Haisma EM**, Rietveld M, El Ghalbzouri A, van den Broek PJ, Dijkshoorn L, Nibbering PH. Three-dimensional human skin equivalent as a tool to study *Acinetobacter baumannii* colonization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 May;56(5):2459-64. doi: 10.1128/AAC.05975-11. Epub 2012 Jan 30.

Haisma EM, Rietveld MH, de Breij A, van Dissel JT, El Ghalbzouri A, Nibbering PH. Inflammatory and antimicrobial responses to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* wound infection model. *PLoS One.* 2013 Dec 10;8(12):e82800. doi: 10.1371/journal.pone.0082800. eCollection 2013.

Geluk A, van Meijgaarden KE, Wilson L, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, van den Eeden SJ, Quinten E, Dijkman K, Franken KL, **Haisma EM**, Haks MC, van Hees CL, Ottenhoff TH. Longitudinal immune responses and gene expression profiles in type 1 leprosy reactions. *J Clin Immunol.* 2014 Feb;34(2):245-55. doi: 10.1007/s10875-013-9979-x. Epub 2013 Dec 27.

Haisma EM, de Breij A, Chan H, van Dissel JT, Drijfhout JW, Hiemstra PS, El Ghalbzouri A, Nibbering PH. LL-37-derived peptides eradicate multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from thermally wounded human skin equivalents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Aug;58(8):4411-9. doi: 10.1128/AAC.02554-14. Epub 2014 May 19.

van Drongelen V, **Haisma EM**, Out-Luiting JJ, Nibbering PH, El Ghalbzouri A. Reduced filaggrin expression is accompanied by increased *Staphylococcus aureus* colonization of epidermal skin models. *Clin Exp Allergy.* 2014 Dec;44(12):1515-24. doi: 10.1111/cea.12443.

den Reijer PM*, **Haisma EM***, Lemmens-den Toom NA, Willemsse J, Koning RI, Demmers JA, Dekkers DH, Rijkers E, El Ghalbzouri A, Nibbering PH, van Wamel W. Detection of Alpha-Toxin and Other Virulence Factors in Biofilms of *Staphylococcus aureus* on Polystyrene and a Human Epidermal Model. *PLoS*

One. 2016 Mar 24;11(3):e0152544. doi: 10.1371/journal.pone.0152544. eCollection 2016.

Haisma EM, Göblyös A, Ravensbergen B, Adriaans AE, Cordfunke RA, Schrumpf J, Limpens RW, Schimmel KJ, den Hartigh J, Hiemstra PS, Drijfhout JW, El Ghalbzouri A, Nibbering PH. Antimicrobial Peptide P60.4Ac-Containing Creams and Gel for Eradication of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Cultured Skin and Airway Epithelial Surfaces. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Jun 20;60(7):4063-72. doi: 10.1128/AAC.03001-15. Print 2016 Jul.

