



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Stratum corneum model membranes : molecular organization in relation to skin barrier function

Groen, D.

Citation

Groen, D. (2011, October 25). *Stratum corneum model membranes : molecular organization in relation to skin barrier function*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17978>

Version: Corrected Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/17978>

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

Samenvatting

Introductie

De hoornlaag, ofwel het stratum corneum (SC), is de dunne bovenste laag van de huid. Het SC bestaat uit platte verhoornde huidcellen (corneocyten) ingebed in een lipidenmatrix. Deze lipiden spelen een zeer belangrijke rol om de doorlaatbaarheid van de huid te minimaliseren en dus ongewenste stoffen buiten het lichaam te houden. Het buiten het lichaam houden van ongewenste stoffen wordt de barrièrefunctie van de huid genoemd. De lipidenmatrix in het SC bestaat voornamelijk uit ceramiden (CER), cholesterol (CHOL) en vrije vetzuren (FFA), die gezamenlijk kristallijne gestapelde lipidenlagen (de zogenaamde lamellen) vormen. Door studies met SC en met lipidenmodellen van SC, is men al veel te weten gekomen over het fasegedrag van de lipiden in het SC. Echter, er is nog weinig bekend over het verband tussen de lipidenorganisatie in het SC en de doorlaatbaarheid van het SC. Door de complexe structuur van het SC bestaande uit eiwitten en lipiden is dit moeilijk te achterhalen. Daarom is er een lipidenmodel ontworpen die de lipidenstructuur in het SC van de huid nabootst. Dit model bestaat uit lipiden aangebracht op een ondersteunend en doorlaatbaar filter. De lipidenorganisatie en de oriëntatie van de lamellen in dit model bootsen die in het SC na. We noemen dit lipidenmodel van het SC het "stratum corneum substituu", ofwel SCS. Het SCS kan gebruikt worden om de permeatie van stoffen te onderzoeken. Door de lipidensamenstelling en daardoor de lipidenorganisatie te veranderen, kunnen we direct een verband leggen tussen de lipidensamenstelling, de lipidenorganisatie en de doorlaatbaarheid van het SCS.

De hoofddoelen van het onderzoek beschreven in dit proefschrift zijn om: 1) de invloed van lipidenorganisatie op de barrièrefunctie van het SCS te onderzoeken en 2) meer inzicht te genereren in de molekuulopbouw van de lamellen in het SC.

Deel I: Het SCS als instrument om de relatie tussen lipiden-samenstelling, organisatie en barrièrefunctie te bestuderen

In eerdere studies is het SCS ontwikkeld, echter, de spraymethode om lipiden op het poreuze membraan aan te brengen was suboptimaal. Daarom worden in het onderzoek beschreven in hoofdstuk 2 twee nieuwe methoden beschreven om het SCS te maken, om zowel de reproduceerbaarheid van het sprayen te verhogen als ook het verlies aan lipiden tijdens het sprayen te beperken. Vervolgens werden de eigenschappen van het SCS onderzocht. De drie methoden om de lipiden te sprayen waren de handmatige airbrushmethode, de rotor-airbrushmethode en de linomatmethode. Uit de resultaten blijkt dat SCS gemaakt met de drie verschillende methoden dezelfde lipiden-samenstelling heeft en dat de lipiden homogeen verdeeld zijn over het substraat. Bovendien vormen de lipiden, ongeacht de gebruikte methode, twee kristallijne lamellaire fasen, waarmee de lipidenorganisatie en oriëntatie in menselijk SC nauwkeurig wordt nagebootst. In de daaropvolgende studies werd de permeatie van benzoëzuur door het SCS gemeten. Hieruit bleek dat de doorlaatbaarheid van het SCS zeer goed overeenkomt met de doorlaatbaarheid van menselijk SC. Wat de drie verschillende methoden betreft: de rotormethode verhoogt de efficiëntie en reproduceerbaarheid in vergelijking met de handmatige airbrushmethode, terwijl de linomatmethode het lipidenverlies tijdens het sprayen sterk vermindert en resulteert in SCS met een meer gelijkmatige dikte van de lipidenfilm over het hele oppervlak. Gebaseerd op deze resultaten werd besloten de linomatmethode in de hieropvolgende studies te gebruiken.

In vervolgstudies werd met behulp van het geoptimaliseerde SCS het effect van de lipidenorganisatie op de doorlaatbaarheid van het SCS bepaald. Deze studies zijn beschreven in hoofdstuk 3. We hebben het effect van de overgang van een zeer dichte orthorombische pakking naar een minder dichte hexagonale lipidenpakking op de barrièrefunctie van het SCS onderzocht en vergeleken met dat in menselijk SC. Dit werd gedaan door de doorlaatbaarheid voor benzoëzuur als functie van de temperatuur in kaart te

brengen. Uit deze metingen werden Arrheniusdiagrammen geconstrueerd. Aangezien de helling van de curves in de Arrheniusdiagrammen boven en onder het overgangstraject nagenoeg hetzelfde is, kunnen we concluderen dat de orthorombisch-hexagonale fase-overgang geen invloed heeft op de diffusie van benzoëzuur door het SCS. Verder was de permeatie van benzoëzuur als functie van temperatuur door het SCS en menselijk SC in het overgangstraject van orthorombisch naar hexagonaal, d.w.z. in het temperatuurgebied tussen de 31 en 43 °C, ook nagenoeg hetzelfde. Van de hellingen in de diagrammen werden activeringsenergieën voor permeatie van benzoëzuur berekend. Het bleek dat de activeringsenergie voor diffusie van benzoëzuur door menselijk SC en SCS erg vergelijkbaar was. Dit bevestigt nogmaals dat de lipiden de voornaamste barrière vormen voor diffusie door het menselijk SC. In de daaropvolgende studies werd de SCS-samenstelling veranderd door de gemiddelde FFA-ketenlengte te verlagen van ongeveer 24 koolstofatomen naar circa 18 koolstofatomen. Dit resulteerde in een hexagonale pakking en een verstoorde lamellaire organisatie. Deze veranderingen in lipidenorganisatie resulteerden in een significant verhoogde doorlaatbaarheid van het SCS voor benzoëzuur. Omdat een orthorombische naar hexagonale overgang nauwelijks invloed heeft op de doorlaatbaarheid, werd de verhoogde doorlaatbaarheid voornamelijk toegeschreven aan de verstoorde lamellaire organisatie. Uit de studies beschreven in hoofdstuk 3 kan geconcludeerd worden dat voor benzoëzuur de juiste lamellaire organisatie in SC belangrijker is voor de barrièrefunctie dan de aanwezigheid van een orthorombische lipidenpakking.

Voor de studies beschreven in hoofdstuk 4 gebruikten we nogmaals het SCS om een systematische verandering in lipidenorganisatie op de lipidenorganisatie en op de barrièrefunctie te onderzoeken, met wederom benzoëzuur als modelstof. In de eerste serie experimenten hebben we de relatieve hoeveelheid van één van de drie hoofdbestanddelen (CER, CHOL en FFA) verhoogd, terwijl de verhouding tussen de andere twee

componenten gelijk bleef. Een dubbele hoeveelheid CHOL resulteerde in een toename van aparte kristallijne gebieden bestaand uit CHOL. Dit leidde tot een verlaging van de doorlaatbaarheid. Een dubbele hoeveelheid CER- of FFA resulteerde in beide gevallen in de vorming van een extra fase, maar dit had geen significante invloed op de doorlaatbaarheid. Daarnaast hebben we ook modellen onderzocht die een verandering in lipidenamenstelling nabootsen die karakteristiek is voor droge of zieke huid. Zo is er in seizoensgebonden droge huid (winter xerosis) een verhoogde hoeveelheid CER EOS-oleaat gemeten ten opzichte van CER EOS-linoleaat. Deze verandering in samenstelling is nagebootst door in het SCS de helft van de CER EOS-linoleaat te vervangen door CER EOS-oleaat. Uit onze röntgenmetingen bleek echter dat dit niet resulteert in een verandering van de lipidenorganisatie. Diffusiestudies met dit aangepaste SCS lieten ook geen verandering in barrièrefunctie zien in vergelijking met onze standaard SCS. Er werd ook een SCS onderzocht waarvan het lipidenprofiel de samenstelling in het SC van psoriasispatiënten benadert. De lipidenorganisatie en barrièrefunctie van dit model waren wederom gelijk aan dat van standaard SCS. Echter, een SCS dat een belangrijk aspect van de specifieke samenstelling in SC van recessief X-linked ichthyosis-patiënten nabootst, namelijk een overmaat aan cholesterolsulfaat, liet een tweemaal hogere doorlaatbaarheid zien ten opzichte van standaard SCS. Deze verhoogde doorlaatbaarheid is mogelijk gerelateerd aan de vorming van een extra, minder goed geordende lamellaire fase in dit model.

Het is voor het eerst dat een lipidenmodel gebruikt is om niet alleen het effect van de lipidenamenstelling op de lipidenorganisatie te onderzoeken, maar ook het effect van de lipidenorganisatie op de barrièrefunctie. Hieruit kunnen zeer relevante conclusies getrokken worden voor met name zieke huid met een afwijkende SC-lipidenamenstelling en barrièrefunctie.

Deel II: De molekuulopbouw van de lamellaire fasen in het SC

Uit röntgendiffractiemetingen met geïsoleerd SC is bekend dat er twee lamellaire fasen aanwezig zijn in de lipidenfractie van het SC. Eén fase met een unieke lange herhalingsafstand van 13 nm (de lange-periodiciteitsfase, ofwel LPP) en één met een kortere herhalingsafstand van ongeveer 6 nm (de korte-periodiciteitsfase, ofwel SPP). Echter, hoewel er al veel bekend is over het fasegedrag van de lipiden in het SC, is de positie van CER-, CHOL- en FFA-molekulen binnen de herhalingsafstand (in de zogenaamde eenheidscel) van de lamellaire fasen grotendeels onbekend. Uit een aantal studies blijkt dat CER EOS, door de bijzondere structuur, een belangrijke rol speelt bij de vorming van de LPP. Vandaar dat we in de studies beschreven in deel II van dit proefschrift de verschillende lamellaire fasen onderzochten in mengsels met CER EOS als enige component, in mengsels met alle CER-klasse(n) (inclusief CER EOS) en in mengsels met alle CER-klasse(n) behalve CER EOS.

Ten eerste onderzochten we of CER EOS in afwezigheid van de andere CER-klasse(n) gemengd met CHOL en FFA dezelfde soort fasen vormt zoals die in SC waargenomen zijn. Deze studies zijn beschreven in hoofdstuk 5. Het fasegedrag werd onderzocht met kleine-hoek röntgendiffractie (SAXD) en Fourier-transformatie-infraroodspectroscopie (FTIR). Uit de SAXD-metingen blijkt dat een equimolair mengsel met CER EOS, CHOL en FFA een lamellaire fase vormt met een bijzonder lange herhalingsafstand van ongeveer 14.7 nm. Deze fase is anders dan de fasen gevormd in menselijk SC. Uit de FTIR metingen bleek dat de FFA- en CER-ketens niet in hetzelfde temperatuursgebied vloeibaar worden. Dit betekent dat tenminste een deel van de FFA- en CER-ketens niet met elkaar mengen. Echter, uit een ander gedeelte van het FTIR spectrum bleek ook dat een deel van de koolstofketens van CER EOS en FFA weldegelijk samen een orthorombische pakking vormen. Gebaseerd op deze waarnemingen, de molekuulstructuur van CER EOS en de lengte van de eenheidscel, is een rangschikking van de FFA-, CER EOS- en CHOL-molekulen in de

eenheidscel van de 14.7 nm lamellaire fase voorgesteld. Dit model bestaat uit drie verschillende lipidenlagen die samen een symmetrische rangschikking binnen de eenheidscel vormen. Gebaseerd op deze rangschikking en op de herhalingsafstand van 14.7 nm werd geconcludeerd dat de molekuulopbouw van deze eenheidscel anders is dan de molekuulopbouw voor de LPP beschreven in hoofdstuk 6. Hieruit blijkt dat er naast CER EOS inderdaad nog meer CER-klassen nodig zijn om de LPP te vormen.

In hoofdstuk 6 wordt de molekuulopbouw binnen de eenheidscel van de LPP in SC in detail onderzocht. Het wordt gesuggereerd dat deze karakteristieke fase erg belangrijk is voor de barrièrefunctie van de huid. Om meer inzicht te krijgen in de moleculaire organisatie van deze unieke fase zijn er SAXD-metingen uitgevoerd met verschillende mengsels die een zodanige samenstelling hadden, dat de lipidenorganisatie in SC werd nagebootst. Echter, deze lipidenmengsels vormden de LPP met kleine verschillen in herhalingsafstand. In het SAXD-patroon van elk van deze mengsels werden tenminste 6 diffractie-orde waargenomen die aan de LPP toegeschreven konden worden, met een herhalingsafstand die varieerde van 12.1 tot 13.8 nm. Met behulp van Shannon's samplingtheorie werden de fasehoeken van de structuurfactoren bepaald die bij de eerste 6 diffractie-orde van de LPP hoorden. Gebruikmakend van de 6 structuurfactoren en fasehoeken werd door middel van Fouriersynthese een hogeresolutie elektronendichtheidsprofiel voor de LPP bepaald. Dit dichtheidsprofiel suggereert een eenheidscel bestaande uit drie opeenvolgende lipidenlagen, met een dikte van 4.5, 4.0 en 4.5 nm. Vervolgens werd met behulp van SAXD-patronen van geïsoleerd SC ook een elektronendichtheidsprofiel van de LPP in SC geconstrueerd. Dit dichtheidsprofiel vertoonde een grote gelijkenis met die van de LPP in de lipidenmengsels. Dit toont aan dat de lipidenmengsels een uitstekend model vormen voor de lipidenorganisatie in SC, niet alleen met betrekking tot de herhalingsafstand van de LPP, maar ook wat betreft de molekuulopbouw in de eenheidscel.

In hoofdstuk 7 wordt de molekuulopbouw van de SPP in detail onderzocht. Om meer inzicht te krijgen in de moleculaire organisatie werden neutronendiffractiestudies uitgevoerd op een mengsel met alle CER-klassen behalve CER EOS. Dit voorkomt de vorming van de LPP. In het diffractiepatroon werden vijf diffractiepieken waargenomen die bij de SPP horen, met een herhalingsafstand van 5.4 nm. Met contrastvariatie (door de verhouding tussen H₂O en D₂O te veranderen) kon het dichtheidsprofiel van de SPP berekend worden. Dit dichtheidsprofiel laat de vorming van een typische bilaag zien. Een mengsel dat een CER bevatte met gedeutereerde vetzuurstaart werd ook onderzocht, om informatie te krijgen over de positie van deze CER-vetzuurstaart in de eenheidscel. Het dichtheidsprofiel van de 5.4 nm fase waarin de CER met gedeutereerde vetzuurstaart aanwezig is correspondeert met 2 ceramiden die tegenover elkaar gesitueerd zijn in de bilaag. De CER hebben een symmetrische verdeling met gedeeltelijk overlappende vetzuurstaarten in het midden van de eenheidscel.

De lamellaire fasen spelen een cruciale rol in de barrièrefunctie van het SC en de studies die hierboven beschreven staan geven nieuw inzicht in de moleculaire rangschikking van lipiden in de lamellen. Het is voor de eerste keer dat de structuur van de lamellaire fasen met zoveel detail beschreven wordt.

Conclusies

In de studies beschreven in het eerste gedeelte van het proefschrift hebben we de spraymethode van het SCS ge-optimaliseerd terwijl de juiste lipidenorganisatie behouden bleef. In eerdere studies was al aangetoond dat het SCS de lipidenorganisatie en barrièrefunctie van menselijk SC nauwkeurig nabootst. Uit de daaropvolgende studies bleek dat het SCS ook een zeer geschikt model is om de relatie tussen lipidenorganisatie en barrièrefunctie te onderzoeken. Interessant genoeg blijkt uit onze resultaten dat het type laterale pakking van de SC-lipiden minder effect heeft op het transport van benzoëzuur dan een verandering van de lamellaire fasen.

Aangezien de vorming van de juiste lipidenfasen cruciaal is voor de barrièrefunctie van de huid, hebben we de moleculaire organisatie in de eenheidscel van deze fasen tot in meer detail bestudeerd. We hebben de verschillende lamellaire fasen bestudeerd in mengsels met alleen CER EOS, in mengsels met 5 CER-klassen aanwezig en in mengsels met dezelfde CER-klassen behalve CER EOS. Uit metingen van het mengsel met CER EOS als enige CER bleek dat in dit mengsel een unieke fase aanwezig is met een zeer lange herhalingsafstand, waarvan de molekuulopbouw in de eenheidscel anders lijkt te zijn dan de molekuulopbouw in de eenheidscel van de LPP. Uit de studies met mengsels waarin alle 5 CER-klassen aanwezig waren bleek dat de eenheidscel van de LPP opgebouwd is uit drie lagen. Studies met mengsels zonder CER EOS lieten een SPP-eenheidscel zien met een symmetrische verdeling van het gedeutereerde CER. Bovendien bleek uit röntgendiffractiestudies met natuurlijk SC dat de molekuulopbouw van de LPP-eenheidscel in onze modellen zeer dicht de de eenheidscel van de LPP in natuurlijk SC benadert. Aangezien de LPP een unieke lamellaire fase is in het SC en geacht wordt een belangrijke rol te spelen in de barrièrefunctie van de huid, bevestigt die laatste observering dat de lipidenmengsels zeer relevante modellen zijn voor onderzoek naar de lamellaire lipidenfasen in het SC.