



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Lipid model membrane systems as a tool for unraveling the underlying factors for skin barrier dysfunction

Uche, L.E.

Citation

Uche, L. E. (2021, December 14). *Lipid model membrane systems as a tool for unraveling the underlying factors for skin barrier dysfunction*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3246835>

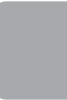
Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3246835>

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

Appendices



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Introductie

De huid beschermt het lichaam tegen het binnen dringen van ziektekiemen en andere gevaarlijke substanties uit de omgeving en verhindert overmatig vochtverlies uit het lichaam. De barrièrefunctie van de huid wordt toegeschreven aan het buitenste laagje van de huid dat bekend staat als het stratum corneum (SC) [1-3]. Het SC bestaat uit met keratine gevulde dode cellen (corneocyten), die zijn ingebed in een lipiden matrix. De corneocyten worden begrensd door een dichte laag met aan elkaar gekoppelde eiwitten die de opname van stoffen in de corneocyten bemoeilijkt. Dit is de rede waarom de lipiden lagen tussen de cellen de belangrijkste penetratie route is voor stoffen door het SC [4-6]. De samenstelling en organisatie van de SC-lipiden zijn dus essentieel voor de barrièrefunctie.

Uit röntgendiffractie studies blijkt dat de lipiden tussen de cellen twee naast elkaar bestaande lamellaire fasen vormen met een repeterende eenheid van ~13 nm en ~6 nm, ook wel de lange en korte periodiciteitsfasen genoemd (LPP en SPP), respectievelijk [7, 8]. De LPP heeft een repeterende eenheid die bestaat uit 3 lipiden lagen. Deze lamellarie fase is uniek voor het SC en dat is de rede waarom deze fase belangrijk wordt geacht voor de huidbarrière. Bij de huidtemperatuur (ongeveer 30-32 °C) vormen de lipiden in de lamellen voornamelijk een dichte orthorombische pakking, terwijl een klein deel van de lipiden zich ordent in de minder compacte hexagonale pakking [9, 10]. Deze dichte orthorombische pakking speelt waarschijnlijk ook een belangrijke rol in de huidbarrièrefunctie [11].

De belangrijkste lipidenklassen in de lipiden matrix in het SC, zijn cholesterol (CHOL), vrije vetzuren (FFAs) en ceramiden (CERs) [12, 13]. Deze lipiden zijn aanwezig in een ongeveer equimolaire verhouding. De FFAs zijn overwegend verzadigd, met vetzuurketens variërend tussen de 12 en 30 koolstofatomen, waarbij de meest voorkomende FFAs een ketenlengte hebben van 22, 24 of 26 koolstofatomen [14-16]. De CERs vertonen een grote variatie in chemische structuur. Ze bestaan uit een sfingoïde base (sfingosine, fytosfingosine, 6-hydroxysfingosine, dihydrosfingosine of 2-hydroxysfingosine) gekoppeld aan een acylketen (non-hydroxy, α -hydroxy of ω -hydroxy) via een amidebinding. De CERs variëren ook in de lengte van hun vetzuur en sphingoïde keten. De meest voorkomende non-hydroxy- en α -hydroxy-acylketens zijn 24 of 26 koolstofatomen lang. Vier van de CER-subklassen, de zogenaamde acylCERs, hebben een ultralange ω -hydroxy-acylketen. De meest voorkomende acyl

ketenlengten zijn 30, 32 of 34 koolstofatomen. Deze acylketens zijn via een ester groep verbonden aan een onverzadigd vetzuur (meestal linolzuur) en via een amide gekoppeld aan één van de verschillende sfingoïde basen. Deze acylCERs zijn cruciaal voor de vorming van de LPP. De meest onderzochte acylCER is CER EOS met een sfingosine base. Op dit moment zijn 18 CER subklassen geïdentificeerd in het menselijk SC (Figuur 1) [17-22].

De samenstelling van de SC lipiden verandert bij inflammatoire huidziekten. Voorbeelden van inflammatoire huidziekten zijn constitutioneel eczeem (atopic dermatitis, (AD)), Netherton-syndroom, psoriasis en autosomaal recessieve congenitale ichthyosis (ARCI) [23-29]. De patiënten met deze huidziekten hebben een verstoorde huidbarrièrefunctie. Hierdoor krijgen schadelijke stoffen makkelijker toegang tot het lichaam. Hoewel in klinische studies correlaties tussen barrièrefunctie en verandering in lipiden samenstelling zijn vastgesteld is het niet mogelijk om het effect van veranderingen in individuele lipidenklassen op de SC lipidenorganisatie en huidbarrièrefunctie in klinisch onderzoek te ontrafelen. Om de rol van lipiden in de verminderde barrière-eigenschappen bij inflammatoire huidziekten in detail te bepalen, bieden modelmembraansystemen op basis van synthetische CERs een uitstekend alternatief, daar de membranen niet gevoelig zijn voor andere storende factoren en slechts één parameter veranderd kan worden.

De studies beschreven in dit proefschrift zijn gericht op het ontrafelen van de onderliggende factoren betreffende lipiden voor de verminderde huidbarrièrefunctie bij inflammatoire huidziekten. Hiertoe werden complexe en eenvoudige modelmembranen gebruikt.

Ontwikkeling van een lipiden modelmembraan voor de gezonde menselijke huid

Omdat de samenstelling in modelmembranen gemakkelijk kan worden gewijzigd, biedt het lipiden modelmembraan de mogelijkheid om de lipiden samenstelling en organisatie na te bootsen van zowel gezonde als zieke huid. Dit maakt het mogelijk gedetailleerder onderzoek uit te voeren naar de relatie tussen lipiden samenstelling, lipidenorganisatie, en barrièrefunctie. In eerdere studies werd het varkens CER-model bestaande uit een gelijke molaire verhouding van synthetische CERs, CHOL en FFAs gebruikt als een model. De samenstelling van het varkens CER-model is echter niet volledig representatief voor de CER samenstelling in SC van gezonde menselijke huid. Daarom is in het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 2** een membraan ontwikkeld dat de samenstelling en organisatie van de lipiden in het SC van menselijke huid nabootst. De

lipidenorganisatie en permeabiliteit van het lipiden modelmembraan werden vergeleken met die van het menselijke SC. In het daaropvolgende onderzoek werd de lipidsamenstelling gevarieerd om verschillende aspecten van de lipidsamenstelling van SC in AD patiënten na te bootsen. De volgende veranderingen in de lipidsamenstelling zijn onderzocht. i) Toevoeging van CERs met een korte totale ketenlengte van 34 koolstofatomen, ii) een afwijkende verhouding van de CER samenstelling, iii) een verlaging van de acylCER concentratie en iv) een verhoging van de concentratie van FFAs met een korte ketenlengte. Om het effect van elk van deze veranderingen op de barrièrefunctie te bepalen, werden twee complementaire technieken gebruikt. Een diffusiestudie werd uitgevoerd om de transportsnelheid van het modelgeneesmiddel ethyl-p-aminobenzoaat (E-PABA) te meten. Tevens werd de verdamping van water via het lipidenmembraan (TEWL-metingen) gemeten. Ook werd het effect van de verandering in lipidsamenstelling op de lipidenorganisatie geanalyseerd.

Uit de resultaten bleek dat de membraan eigenschappen van het gezonde huidmodel vergelijkbaar zijn met die van het menselijk SC. De lipiden in het membraan vormden de 2 lamellaire fasen (SPP en LPP), een orthorombische laterale pakking en ze vertoonden geen significant verschil in de permeabiliteit in vergelijking met menselijke SC. Het model werd dus goed genoeg bevonden om het effect van de afwijkende lipidsamenstellingen te onderzoeken. Uit deze onderzoeken bleek dat de sterkste vermindering van de barrièrefunctie werd waargenomen in het model met een verhoogde fractie FFAs met korte ketens. Deze verandering leidde tot een verlaagde dichtheid van de pakking van de ketens. Verder bleek dat verlaging van de concentratie acylCERs resulteerde in een sterk verlaagde fractie lipiden die de LPP vormden, maar dit had een kleiner effect op de permeabiliteit. Onze bevindingen suggereren dat bij de behandeling van AD, de normalisatie van de FFA-samenstelling minstens zo belangrijk is als de normalisatie van de CER-samenstelling.

Eenvoudige modelsystemen voor een gedetailleerde evaluatie van de relatie tussen lipidsamenstelling, lipidenorganisatie en barrièrefunctie.

De interpretatie van het fasegedrag van de lipiden in eenvoudige systemen is gedetailleerder dan in complexe systemen, aangezien wisselwerking van meerdere lipiden subklassen niet optreedt en er ook meer gedetailleerde informatie kan worden verkregen door gebruik te maken van gedeutereerde lipiden. Daarom werden lipiden modellen met een kleiner aantal componenten onderzocht, met steeds dezelfde molaire verhouding CERs, CHOL en FFAs. De relatie tussen

veranderingen in CER subklassen en de verandering in ketenlengte op de lipidenorganisatie en permeabiliteit kon zo in meer detail worden onderzocht.

Hoofdstuk 3 beschrijft studies met verschillende hoeveelheden CER EOS in het modelmembraan. Aangezien de CER EOS concentratie de vorming van de LPP beïnvloedt, werden eenvoudige modelmembranen met geleidelijk toenemende verhoudingen van CER EOS (10/30/50/70/90 mol% van de totale hoeveelheid CERs) gebruikt voor een gedetailleerd onderzoek naar de invloed van de CER EOS concentratie op zowel de lamellaire organisatie als op de laterale organisatie en permeabiliteit van het modelmembraan. Uit de resultaten bleek dat de permeabiliteit van het model niet veranderde wanneer de CER EOS concentratie tussen 10 en 30% van de totale CER concentratie lag, maar significant toenam bij 70% en hogere concentraties, terwijl de fractie van lipiden die een orthorombische fase vormden was toegenomen. Uit metingen van een lipidenamenstelling met CER EOS met een onverzadigde gedeutereerde C18-keten bleek dat de fractie lipiden in een vloeibare fase toenam wanneer de CER EOS concentratie toenam. Hoogstwaarschijnlijk draagt dit bij tot de verhoogde permeabiliteit bij een hogere CER EOS concentratie. De omringende CERs en FFAs vormden onafhankelijk van de hoeveelheid CER EOS onveranderd een kristallijne orthorombische fase. Ook werd de lamellaire organisatie van de modellen geanalyseerd. Bij 10% CER EOS vormde het model zowel de LPP als de SPP, dit is een vergelijkbare concentratie acylCERs als in menselijke huid, waar zowel de SPP en LPP aanwezig zijn. Bij een concentratie CER EOS van 30% en hoger werd alleen de LPP gevormd. Uit röntgendiffractie resultaten bleek dat de verhouding van de piekintensiteiten in het diffractiepatroon van de LPP gehandhaafd bleef bij mengsels tot 70% CER EOS-concentratie en kwam overeen met de verhouding van de diffractiepieken in het diffractiepatroon van het complex SC-model en van de LPP in humaan SC (2e-orde piek hogere intensiteit dan 1e en 3e-orde pieken), zoals eerder beschreven [30, 31]. Dit betekent dat de basis van de LPP structuur in modelmembranen met een verschillende samenstelling veel overeenkomst vertonen. De lipiden modelmembranen uit de studies in hoofdstuk 4 en 5, werden bereid met gelijke mol-verhouding CERs, CHOL en FFAs, waarbij de CER-fractie 40% CER EOS bevatte. Hiervoor werd gekozen omdat dit leidt tot modellen die alleen de LPP vormen en niet de SPP (hierna LPP-modellen genoemd). Deze twee onderzoeken zijn onderdeel van het lopende onderzoek binnen onze groep om de moleculaire interactie en rangschikking van lipiden binnen de LPP-structuur in detail te karakteriseren.

In **Hoofdstuk 4** worden studies beschreven waarin eenvoudige LPP modellen werden gebruikt om in meer detail het effect van verschillende CER kopgroepen

op de lipidenorganisatie en barrièrefunctie van SC modelmembranen te onderzoeken. De focus lag op zowel op sfingosine als op fytosfingosine gebaseerde CERs, aangezien de hoeveelheid van beide groepen verandert in het SC van AD en psoriasis patiënten. Modelmembranen met 40% CER EOS en op sfingosine gebaseerde CERs (CER NS of CER AS) werden vergeleken met modellen waarin hun tegenhangers de op fytosfingosine gebaseerde CERs (CER NP of CER AP) zijn geïncorporeerd. De permeabiliteit werd vergeleken door diffusiestudies met E-PABA als modelgeneesmiddel uit te voeren. Tevens werd de lipidenorganisatie onderzocht met röntgendiffractie en infraroodspectroscopie. Zowel de mengels met CERs gebaseerd op sfingosine als op fytosfingosine vormden de LPP. Echter mengels gebaseerd op fytosfingosine vormden een LPP met een langere periodiciteit en extra fasen. De E-PABA-flux door de sfingosine gebaseerde CER modellen was hoger dan door de modellen gebaseerd op fytosfingosine CERs. Belangrijk was de constatering dat het CER model gebaseerd op α -hydroxy-fytosfingosine (CER AP) de laagste pakkingsdichtheid had: voornamelijk een hexagonale pakking. De onverwachts lage permeabiliteit van dit model wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de sterkere waterstofbrug binding tussen de kopgroepen van de lipiden. Uit onze bevindingen blijkt dat de verhoogde concentratie op sfingosine gebaseerde CERs (ten opzichte van de fytosfingosine), zoals waargenomen in zieke huid, mogelijk bijdraagt aan de verminderde barrièrefunctie.

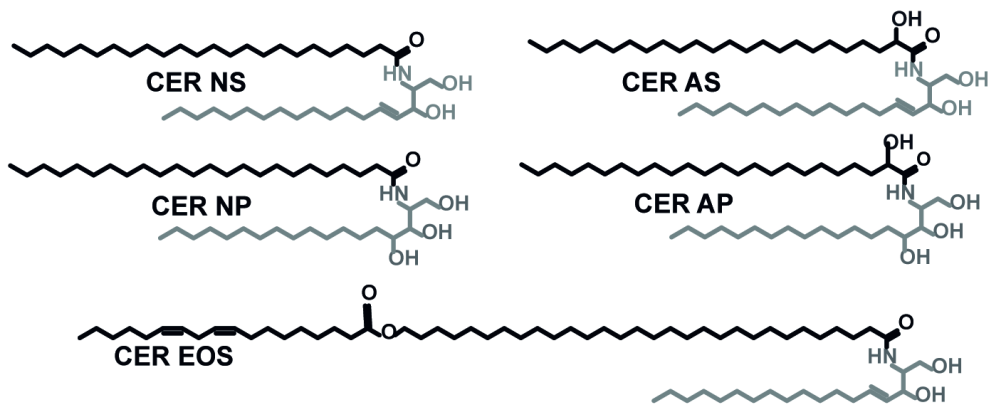
In het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 5** werden modellen waarin de lipiden alleen de LPP vormen met een systematische verhoging van C34 CERs (CERs met een totale ketenlengte van 34 koolstofatomen) onderzocht. Interessant, omdat een verhoogde concentratie C34 CERs ook is waargenomen in SC van AD huid. Het modelsysteem bestond uit slechts 4 componenten, CER EOS, CER NS, CHOL en FFA met 24 koolstofatomen (FAC24). In dit onderzoek werd de fysiologische acylketenlengte van CER NS (totaal aantal koolstof atomen in de keten 42) met 24 koolstofketens in de acylketen (CER NS(C24)) in het modelmembraan geleidelijk vervangen door C34 CER NS met 16 koolstofatomen in de acylketen CER NS(C16). Het effect van een systematische verhoging van de concentratie CER NS(C16) ten koste van CER NS(C24) op de permeabiliteit en het fasegedrag van de modelmembranen werd onderzocht. De zwakste barrière van het SC model werd waargenomen, wanneer 75 mol% van de CER NS (24) werd vervangen door CER NS (C16). Uit zowel de diffractie als infrarood experimenten bleek dat bij deze concentratie CER NS(C16) verschillende fasen gevormd werden, waarbij vooral de vetzuren uitkristalliseerden in aparte domeinen. Deze bevindingen dragen bij aan de mogelijke effecten die een verhoogde

concentratie C34 CER heeft op de lipidenorganisatie en barrierefunctie in inflammatoire huidziekten waaronder AD en Netherton-syndroom.

Conclusie

Er is een lipiden modelmembraan ontwikkeld dat de lipiden samenstelling, organisatie en permeabiliteit van menselijk SC nabootst. Door de samenstelling van dit model systematisch te veranderen is meer informatie verzameld over het effect van de verandering in de lipiden samenstelling in inflammatoire huidziekten. Uit het onderzoek bleek dat een verhoogde concentratie FFAs met korte ketens resulteerde in een sterke verminderde barrierefunctie. Veranderingen in de CER-subklassen samenstelling en ketenlengte hadden een veel kleiner effect. De verandering in de FFAs verlaagde de pakkingsdichtheid van de lipiden ketens, terwijl modulaties in de CER samenstelling de lamellaire organisatie en kopgroep interacties beïnvloedden.

Uit de studies beschreven in dit proefschrift bleek verder dat eenvoudige modellen die belangrijke aspecten van de menselijke SC lipidenorganisatie nabootsen, geschikt zijn voor gedetailleerde studies en tot een beter begrip leiden betreffende de rol van lipiden in de veranderingen in de lipidenorganisatie en barrierefunctie zoals waargenomen bij inflammatoire huidziekten. Het ontrafelen van de factoren en de mechanismes die ten grondslag liggen aan de verstoring van de barrierefunctie is van het grootste belang voor een doelmatige, optimale therapie.



Figuur 1: Sommige CER-subklassen in het lipidenstelsel van het stratum corneum.

CER's bestaan uit een sfingoïde basis gekoppeld aan een FA-keten. De acylketen kan ofwel niet-gehydroxyleerd (N), α-gehydroxyleerd (A), of veresterd ω-gehydroxyleerd (EO) zijn, terwijl de sfingoïde-base uit sfingosine (S), of fytosfingosine (P) bestaat.