



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Systematic investigations into the role of ceramide subclass composition on lipid organization and skin barrier

Nadaban, A.

Citation

Nadaban, A. (2024, May 16). *Systematic investigations into the role of ceramide subclass composition on lipid organization and skin barrier*.

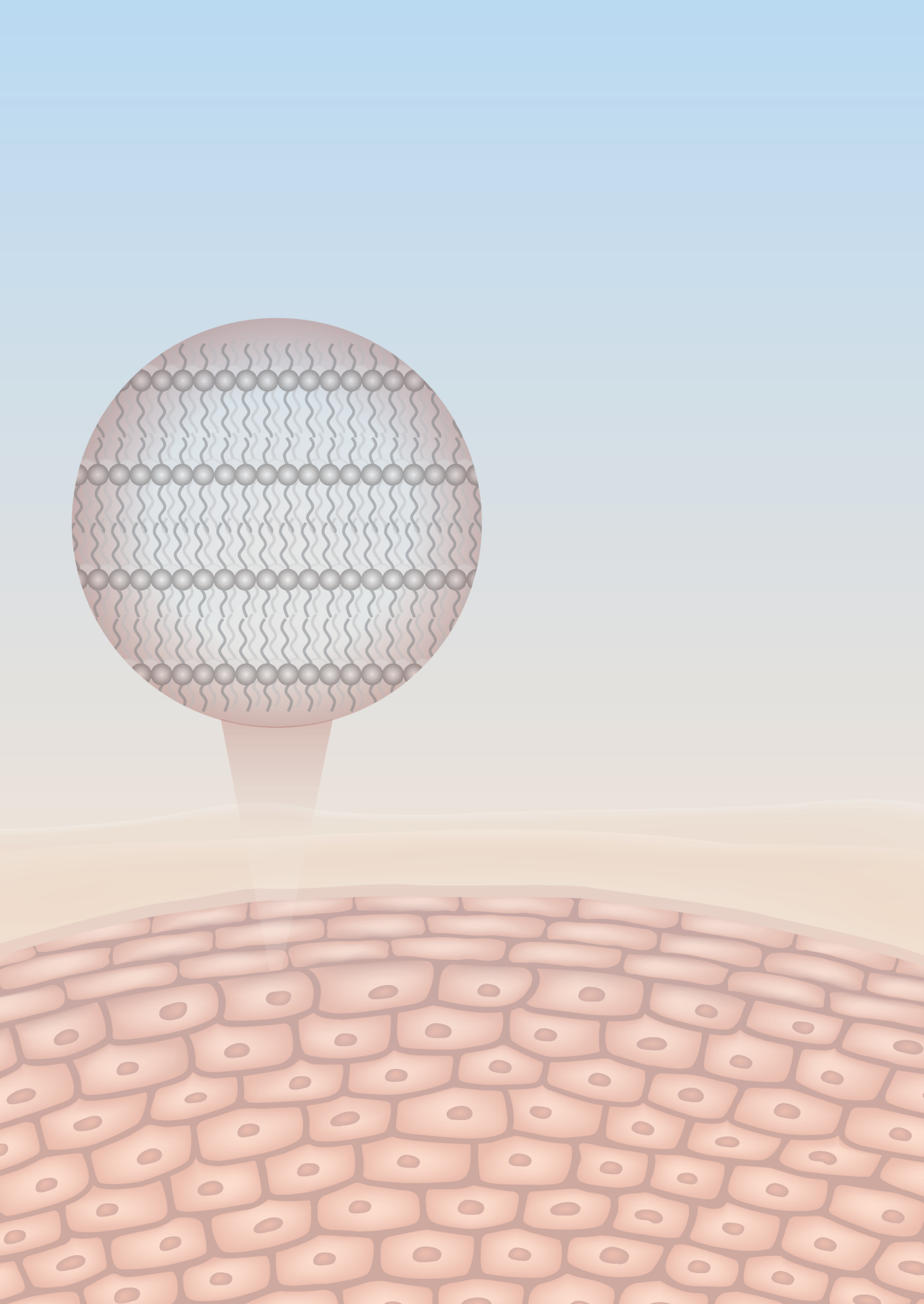
Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3754008>

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/1887/3754008>

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



APPENDICES

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Introductie

De huid is het grootste orgaan van het lichaam en vormt de belangrijkste barrière tegen factoren van buitenaf. Andere essentiële biologische functies van de huid zijn thermoregulatie, het waarnemen van externe omgevingsprikkels zoals pijn en warmte, de synthese van vitamine D en de uitscheiding van ureum en zouten (1). De menselijke huid bestaat uit de epidermis (opperhuid), de dermis (lederhuid) en de hypodermis (het onderhuids bindweefsel) (2). De epidermis is de buitenste laag van de huid en vernieuwt zich continu. De epidermis bestaat uit vier verschillende lagen: het stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum en stratum corneum (SC). De barrièrefunctie van de huid wordt voornamelijk gevormd door het SC, de bovenste laag van de epidermis (3). De enige continue transportroute door de huid wordt gevormd door de lipidenmatrix in het SC. Hierdoor spelen de SC lipiden een belangrijke rol bij het voorkomen van overmatig vochtverlies vanuit het lichaam en het tegenhouden van ongewenste stoffen uit het externe milieu.

De lipiden in de SC lipidenmatrix zijn onder te verdelen in drie groepen, namelijk ceramiden (CERs), cholesterol (CHOL) en vrije vetzuren (FFAs). Deze zijn ongeveer in een equimolaire verhouding aanwezig in het menselijk SC (4). CERs maken deel uit van de sfingolipidenfamilie en zijn naast hun belangrijke functie bij de vorming van de huidbarrière ook betrokken bij cellulaire processen, zoals apoptose, proliferatie en de differentiatie van huidcellen (5, 6). CERs bestaan uit een sfingoïde base die via een amidebinding gekoppeld is aan een acylketen. Tot nu toe zijn er 25 verschillende CER subklassen geïdentificeerd in menselijk SC (7). Een aantal CER subklassen belangrijk in het onderzoek beschreven in dit proefschrift bestaan uit een sfingoïde base (sfingosine, fytosfingosine) gekoppeld aan een non-hydroxy acylketen via een amidebinding, genoemd CER NS and CER NP. Een andere CER subklasse, CER EOS, heeft een ultralange ω -hydroxy-acylketen, die via een ester groep verbonden aan een onverzadigd vetzuur en via een amide gekoppeld aan een sfingosine base. CER EOS is cruciaal voor de vorming van de LPP.

De CERs variëren ook in de lengte van hun vetzuur en sfingoïde keten. Elke subklasse heeft een grote verscheidenheid aan aantal koolstofatomen in zowel de acylketen als de keten van de sfingoïde base. De totale ketenlengte (acyl + sfingoïde base) ligt meestal tussen 32 en 72 koolstofatomen, waarbij de variatie in de lengte van de acylketen groter is dan de variatie in de lengte van de sfingoïde base (7-9).

De SC lipiden vormen opeen gestapelde laagjes, de zogenaamde lamellaire fasen, waarbij de lamellen bij benadering parallel aan het oppervlak van de SC georiënteerd zijn (10). Uit röntgendiffractie studies van menselijk SC bleek dat er twee lamellaire fasen met repeterende eenheden van ongeveer 13 nm en 6 nm aanwezig zijn. Deze lamellaire fasen worden aangeduid als de lange periodiciteitsfase (LPP) en korte periodiciteitsfase (SPP) (11, 12). Binnen de lamellaire fasen in het SC kunnen de lipiden in verschillende

dichtheden gerangschikt worden, aangeduid als de laterale pakking: een orthorombische (een kristallijne fase met een zeer dichte pakking), hexagonale (een geordende fase, maar de lipidenketens bevinden zich verder van elkaar) of een vloeibare fase (een zeer ongeordende fase) (13-15). De lipiden in menselijk SC zijn voornamelijk georganiseerd in een dichte kristallijne orthorombische pakking, maar een klein deel van de lipiden vormt een hexagonale pakking of zelfs een vloeibare fase (16, 17).

Bij inflammatoire huidziekten, zoals constitutioneel eczeem, psoriasis of Netherton-syndroom, verschilt de SC lipidenamenstelling van die in gezond SC en is de barrièrefunctie van de huid aangetast (18-24). Veranderingen in de SC lipidenamenstelling zijn, onder andere, een verhoogd percentage onverzadigde CERs en FFAs, een kortere koolstofketenlengte van de CERs en FFAs, en een afwijkende samenstelling van CER subklassen. In klinische studies konden deze veranderingen worden gecorreleerd met een verminderde barrièrefunctie. Dit is bepaald door de verdamping van water door de huid te meten, het zogenaamde trans-epidermaal waterverlies (TEWL). Aangezien verschillende veranderingen in de lipidenamenstelling gelijktijdig optreden in inflammatoire huid, kan er geen causaal verband gelegd worden tussen de verhoogde TEWL en de lipidenamenstelling in klinische studies. Lipidenmodellen vormen een alternatief om systematisch de rol van specifieke lipiden op de barrièrefunctie van de huid te onderzoeken. Dit wordt beschreven in **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift.

Het verband tussen lipidenamenstelling, lipidenorganisatie en barrièrefunctie

De studies beschreven in dit proefschrift richten zich op het effect van de verandering in CER subklasse samenstelling op de lipidenorganisatie en de barrièrefunctie. Allereerst werd de CER samenstelling van een inflammatoire huidziekte, seborroïsch eczeem (SE), onderzocht in een klinische studie. In de vervolgonderzoeken werden lipidenmodelsystemen gebruikt om het effect van veranderingen in de samenstelling van de CER subklassen op de lipidenorganisatie en de barrièrefunctie (gevormd door de lipiden) te onderzoeken.

In **Hoofdstuk 2** worden huidbarrière verstoring, veranderingen in het microbioom en de veranderingen in CER samenstelling in de huid van patiënten met SE beschreven. De belangrijkste kenmerken van deze inflammatoire huidaandoening zijn een ontregeld immuunsysteem resulterend in inflammatie, cutane microbiële dysbiose en een aangetaste huidbarrièrefunctie. Het doel van de studie was om de CER samenstelling van aangedaan en niet-aangedaan SC van 37 SE patiënten te karakteriseren en deze te relateren aan de barrièrefunctie. Uit de resultaten blijkt dat de aangedane huid een significant slechtere huidbarrière heeft. Dit was gebaseerd op TEWL metingen. Tevens was er een significante correlatie tussen de TEWL-waarden en veranderingen in de CER samenstelling. Er was een i) een positieve correlatie met de molaire verhouding tussen CER NS en CER NP, ii) een positieve correlatie met de mate van aanwezigheid van CER NS met een totale ketenlengte van 34 koolstofatomen (C34), iii) een positieve correlatie met

de mate van onverzadiging in CER NS en iv) een negatieve correlatie met de gemiddelde totale ketenlengte van CERs. Uit deze resultaten blijkt dat de aangetaste barrièrefunctie afhankelijk is van de CER samenstelling in SE. De invloed van de CER ketenlengte, de mate van onverzadiging en de grotere fractie CER NS C34 op de barrièrefunctie zijn al onderzocht met behulp van de lipidenmodelsystemen. Het bleek dat al deze veranderingen de lipidenbarrière verminderen. Echter, het effect van veranderingen in de molaire verhouding van CER NS:CER NP op de barrièrefunctie was nog niet onderzocht.

Om de rol van CER NS en CER NP in de barrièrefunctie beter te begrijpen was het doel van het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 3** om de positie van CER *N*-(tetracosanoyl)-phytosphingosine (CER NP C24) in de repeterende eenheid (de zogenaamde eenheidscel) van de LPP te onderzoeken. Deze positie werd vervolgens vergeleken met de positie van CER *N*-(tetracosanoyl)-sphingosine (CER NS C24). We kozen voor CER NP omdat deze CER subklasse het meest voorkomt in het menselijk SC en zijn locatie in de LPP-eenheidscel nog niet was bepaald. De gedetailleerde analyse werd uitgevoerd met Fourier-transform infraroodspectroscopie (FTIR) en neutronendiffractie. Voor dit onderzoek zijn gedeutereerde lipiden nodig, dus werd een eenvoudig lipidenstelsel gebruikt met slechts 3 CER, subklassen namelijk CER NS C24 en CER NP C24 en CER EOS. CER EOS zorgt er voor dat alleen de LPP gevormd wordt. Deze CER subklassen werden gecombineerd met CHOL en een FFA met ketenlengte van 24 koolstofatomen (FFA C24). De verhouding van CER NS:CER NP was 1:1. Uit de neutronendiffractie studies bleek dat deze lipidencombinatie een repeterende eenheidscel vormt die uit drie lagen bestaat: een centrale laag met aan weerszijden een buitenlaag. Uit het onderzoek blijkt dat de positie van CER NP C24 vergelijkbaar is met de positie van CER NS in deze LPP eenheidscel, waarbij de acylketens van CER NP zich voornamelijk in de centrale laag bevinden. Uit de daarop volgende FTIR-studies bleek dat de acylketens van CER NP en CER NS en de FFA C24 ketens naast elkaar liggen in de centrale laag van de eenheidscel. Dit kan alleen als CER NP een lineaire conformatie aanneemt, met de acylketen en sfingoïde basis aan weerszijden van de hydrofiele kopgroep, vergelijkbaar met conformatie van CER NS. De resultaten van deze studie vormden het uitgangspunt om het effect van een verandering in de verhouding tussen CER NS en CER NP in detail te onderzoeken, zoals beschreven in het volgende hoofdstuk.

Het effect van een veranderde CER NS: CER NP ratio op de lipidenorganisatie en lipidenbarrière stond centraal in **hoofdstuk 4**. Deze verhouding verandert niet alleen in aangedane huid van SE, maar ook bij andere inflammatoire huidziekten zoals constitutioneel eczeem en psoriasis. De lipidenmodellen werden bereid met een CER NS:CER NP verhouding van 1:2 (vergelijkbaar met de verhouding in gezonde SC) en 2:1 (vergelijkbaar met de verhouding in SC van inflammatoire huidziekten). De lipidenorganisatie en barrièrefunctie van de modellen werden onderzocht. De lipiden in beide samenstellingen vormden de LPP. Er werd gebruik gemaakt van neutronendiffractie en FTIR. Uit de metingen bleek dat binnen de eenheidscel van de LPP de positie van CER

NS en CER NP sterk overeenkomt met de posities gevonden wanneer de verhouding CER NS:CER NP 1:1 was gebruikt. Beide acylketens waren voornamelijk gelokaliseerd in de centrale laag van de eenheidscel. Ook nu werd weer TEWL gebruikt om de barrièrefunctie te onderzoeken, maar nu de barrière van de lipidenmodellen. De TEWL waarden waren significant hoger in het CER NS:CER NP 2:1 model dan in het CER NS:CER NP 1:2 model, maar de veranderingen waren beperkt. Deze bevindingen geven een gedetailleerder inzicht in de lipidenorganisatie in zowel gezonde als zieke huid. Hieruit kunnen we concluderen dat in klinische studies de molaire verhouding tussen CER NS:CER NP wel bijdraagt aan een barrièreverstoring, maar waarschijnlijk niet de primaire factor is.

In **hoofdstuk 5** werd een lipidenmodel gebruikt dat uitsluitend de SPP vormt om te onderzoeken of het effect van een gewijzigde molaire verhouding CER NS:CER NP op de lipidenorganisatie vergelijkbaar is met het effect dat in de eenheidscel van de LPP werd waargenomen. Er werd gebruik gemaakt van eenvoudige lipidenmodellen bestaande uit CHOL, FFA C24 en CER NS en CER NP (molaire verhouding 1:2 vergelijkbaar met gezond SC en 2:1 vergelijkbaar met inflammatoire huidziekten), maar nu zonder CER EOS. Uit de resultaten blijkt dat de acylketens van CER NS, CER NP en FFA C24 naast elkaar liggen in de SPP eenheidscel, waarbij CER NS en CER NP een lineaire conformatie aannemen, vergelijkbaar met de ordening in de binnenste laag van de LPP-modellen beschreven in het vorige hoofdstuk. Het SPP NS:NP 1:2 model wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van een andere fase die CER NP bevat. In tegenstelling tot het SPP-model wordt fasescheiding niet waargenomen in de LPP-modellen en dit suggereert dat de toevoeging van CER EOS de menging van de lipiden in het model verbetert. Uit FTIR metingen blijkt dat de twee SPP-samenstellingen verschillende waterstofbrug bindingen hebben: het CER NS:CER NP 1:2-model vertoonde een sterkere waterstofbrug binding dichtheid dan het CER NS:CER NP 2:1-model. Dit wordt veroorzaakt door de intermoleculaire waterstofbruggen tussen de CER NP-kopgroepen.

In de eerdere studies werden eenvoudige systemen gebruikt met slechts twee of drie CER-subklassen. In **hoofdstuk 6** worden studies beschreven waarin het aantal CER-subklassen is uitgebreid om te onderzoeken of complexe lipidenmodellen de lipidenorganisatie en barrièrefunctie beïnvloeden. Eerst werden lipidenmengsels onderzocht met vier CER-subklassen, waarbij ofwel *N*-(2R-hydroxy-tetracosanoyl)-sfinosine (CER AS C24), *D*-(2R-hydroxy-tetracosanoyl)-fytosfingosine (CER AP C24) of CER *N*-(tetracosanoyl)-dihydrosfingosine (CER NdS C24) werden gebruikt als extra CER-subklasse. Ook werd weer CER EOS toegevoegd om voornamelijk de LPP te vormen. De lipidenorganisatie, moleculaire rangschikking en permeabiliteit van de LPP-modellen werden onderzocht. Uit de resultaten blijkt dat het toevoegen van een extra CER-subklasse de positie van de acylketens van CER NS en CER NP in de LPP drielagen eenheidscel niet verandert. Naast de eenvoudige modellen werd ook een complex lipidenmodel onderzocht met een CER samenstelling die lijkt op de samenstelling in menselijke SC. De twee acylketens van CER NS en CER NP behielden nog steeds hun positie

in de binnenste laag van de eenheidscel. Hieruit blijkt een opmerkelijke ongevoeligheid voor de positie van de acylketens van CER NS en CER NP in de LPP-eenheidscel wanneer de samenstelling van de CER subklassen verandert. De verschillende kopgroepstructuren van CER AS, CER AP en CER NdS hadden een effect op de waterstofbrug vorming in de lipidenmodellen: de toevoeging van CER AP (met de meeste hydroxy groepen in het molecuul) resulteerde in een sterkere waterstofbrug binding in vergelijking met de andere twee modellen.

Conclusie

Uit de in **Hoofdstuk 2** beschreven studies blijkt dat SE worden gekenmerkt door een verminderde huidbarrière en een veranderde CER samenstelling in het SC. Deze veranderingen in lipidenamenstelling en barrièreverstoring zijn vergelijkbaar met veranderingen gevonden in andere inflammatoire huidziekten, waaronder constitutioneel eczeem, psoriasis en het Netherton syndroom. Eerder werd het effect van een aantal veranderingen in de lipidenamenstelling, zoals de kortere ketenlengte van de FFAs en CERs en de onverzadigingsgraad van FFAs, onderzocht met behulp van lipidenmodellen. Het effect van de verhouding CER NS:CER NP, een van de belangrijkste veranderingen in zieke huid, werd echter niet onderzocht. Zoals beschreven in **hoofdstuk 4** werd er een significante toename van de TEWL-waarden waargenomen voor de CER NS:CER NP 2:1 ratio (zieke SC) in vergelijking met de CER NS:CER NP 1:2 ratio (gezonde SC). Dit is een indicatie dat een hogere CER NS:CER NP ratio bijdraagt aan een verminderde barrièrefunctie.

De onderzoeken beschreven in de **hoofdstukken 4, 5 en 6** leiden tot een beter begrip van de invloed van de samenstelling van de CER subklassen op de lipidenorganisatie en de barrièrefunctie. Uit deze studies blijkt dat de lamellaire organisatie niet verandert wanneer de samenstelling van de CER kopgroep verandert (met uitzondering van CER EOS) en dat er alleen kleine veranderingen worden waargenomen in de laterale pakking.

Uit de beschreven studies blijkt dat het onderzoeken van eenvoudige lipidenmodelsystemen bijdraagt tot een beter inzicht in de veranderingen in lipidenamenstelling zoals waargenomen in inflammatoire huidziekten.

REFERENCES

1. Chuong, C. M., Nickoloff, B. J., Elias, P. M., Goldsmith, L. A., Macher, E., Maderson, P. A., et al. (2002). What is the 'true' function of skin? *Experimental Dermatology*. 11(2), 159-87.
2. Proksch, E., Brandner, J. M., Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 17(12), 1063-72.
3. Menon, G. K., Cleary, G. W., Lane, M. E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm*. 435(1), 3-9.
4. Weerheim, A., Poncet, M. (2001). Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res*. 293, 191-9.
5. Hannun, Y. A., Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(2), 139-50.
6. Cha, H. J., He, C., Zhao, H., Dong, Y., An, I. S., An, S. (2016). Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review). *Int J Mol Med*. 38(1), 16-22.
7. Kawana, M., Miyamoto, M., Ohno, Y., Kihara, A. (2020). Comparative profiling and comprehensive quantification of stratum corneum ceramides in humans and mice by LC/MS/MS. *J Lipid Res*. 61(6), 884-95.
8. Ohnari, H., Naru, E., Sakata, O., Obata, Y. (2023). Distribution of Domains Formed by Lateral Packing of Intercellular Lipid in the Stratum Corneum. *Chem Pharm Bull*. 71, 31-40.
9. Masukawa, Y., Narita, H., Sato, H., Naoe, A., Kondo, N., Sugai, Y., et al. (2009). Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res*. 50(8), 1708-19.
10. Madison, K. C., Swartzendruber, D. C., Wertz, P. W., Downing, D. T. (1987). Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J Invest Dermatol*. 88(6), 714-8.
11. Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., van der Spek, J. A., Bras, W. (1991). Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J Invest Dermatol*. 97(6), 1005-12.
12. Garson, J. C., Doucet, J., Leveque, J. L., Tsoucaris, G. (1991). Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. *J Invest Dermatol*. 96(1), 43-9.
13. Mendelsohn, R., Rerek, M. E., Moore, D. J. (2000). Infrared spectroscopy and microscopic imaging of stratum corneum models and skin. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2(20), 4651-7.
14. Boncheva, M., Damien, F., Normand, V. (2008). Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 1778(5), 1344-55.
15. Damien, F., Boncheva, M. (2010). The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 130(2), 611-4.
16. Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Salomons-de Vries, M. A., van der Spek, J. A., Bras, W. (1992). Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle X-ray diffraction study. *Int J Pharm*. 84, 205-16.
17. Björklund, S., Nowacka, A., Bouwstra, J. A., Sparr, E., Topgaard, D. (2013). Characterization of Stratum Corneum Molecular Dynamics by Natural-Abundance ¹³C Solid-State NMR. *PLoS One*. 8(4), e61889.
18. Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S., Ghidoni, R. (1993). Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta*. 1182, 147-51.
19. Di Nardo, A., Wertz, P. W., Giannetti, A., Seidenari, S. (1998). Ceramide and Cholesterol Composition of the Skin of Patients with Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol* 78, 27-30.
20. Ishikawa, J., Narita, H., Kondo, N., Hotta, M., Takagi, Y., Masukawa, Y., et al. (2010). Changes in the Ceramide Profile of Atopic Dermatitis Patients. *J Invest Dermatol*. 130(10), 2511-4.
21. Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G. S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P. J., et al. (2012). Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res*. 53(12), 2755-66.
22. van Smeden, J., Janssens, M., Boiten, W. A., van Drongelen, V., Furio, L., Vreeken, R. J., et al. (2014). Intercellular skin barrier lipid composition and organization in Netherton syndrome patients. *J Invest Dermatol*. 134(5), 1238-45.
23. Yokose, U., Ishikawa, J., Morokuma, Y., Naoe, A., Inoue, Y., Yasuda, Y., et al. (2020). The ceramide [NP]/[NS] ratio in the stratum corneum is a potential marker for skin properties and epidermal differentiation. *BMC Dermatology*. 20(1).
24. Uchino, T., Kamiya, D., Yagi, H., Fujino-Shimaya, H., Hatta, I., Fujimori, S., et al. (2023). Comparative analysis of intercellular lipid organization and composition between psoriatic and healthy stratum corneum. *Chem Phys Lipids*. 254, 105305.