



Microbioom van de huid

P.L.J.M. Zeeuwen¹, T.H.A. Ederveen², D.A. van der Krieken³, G. Rikken⁴, J. Schalkwijk⁵, E.H. van den Bogaard⁶

Atopisch eczeem is geassocieerd met een verstoorde samenstelling van het huidmicrobioom, gekenmerkt door een verminderde diversiteit aan micro-organismen en een overgroei van *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)-bacteriën. Ons recente onderzoek heeft aangetoond dat mutaties in het *filaggrine*-gen (FLG) van invloed zijn op de microbiotacompositie van de huid en de cutane afweerreactie van de gastheer. Om causale verbanden tussen genetische varianten, een verstoorde huidbarrière, microbiotadysbiose en ziektepathogenese te kunnen vinden, zijn uitgebreide en technisch uitdagende in-vitrostudies nodig die uiteindelijk zouden kunnen leiden tot nieuwe therapeutische (microbioom)-interventies voor behandeling van deze huidaandoening.

Onze huid wordt bevolkt door miljoenen bacteriën, schimmels en virussen die de huidmicrobiota vormen. Micro-organismen hebben een belangrijke rol in de bescherming tegen binnendringende ziekteverwekkers, de vorming en het onderhoud van ons immuunsysteem, de productie van vitamines en voedingsstoffen via biosynthese en de afbraak van natuurlijke producten. [1] De eerste studies, die gebruikmaakten van de nieuwste sequentieanalyse-technologieën, meldden dat het huidmicrobioom van gezonde vrijwilligers grofweg kan worden ingedeeld in vier verschillende fyta, namelijk Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria en Bacteroidetes. Ook bleek dat specifieke bacteriën geassocieerd zijn met vochtige, droge en talgrijke delen van de huid. [2,3] Omdat microben zo belangrijk zijn voor het menselijk leven, zijn veranderingen in de samenstelling van microbiomen betrokken bij gezondheid en ziekte. [4] Ook dysbiose van cutane microbiota wordt in verband gebracht met het ontstaan van verschillende huidziekten zoals atopisch eczeem, psoriasis, acne, rosacea, primaire immunodeficiënties, seborroïsch eczeem en roos. [5,6] Bij atopisch eczeem wordt sinds lange tijd een verband gezien tussen de aanwezigheid van *S. aureus* en ziekteactiviteit. [7] Dit werd bevestigd in een longitudinale microbiomstudie van de lesionale huid van patiënten met atopisch eczeem tijdens behandeling met medicijnen. Er werd gesuggereerd dat behandeling van de ziekte microbiële diversiteit promoot, die dan leidt tot een klinische verbetering van de ziekte. [8] Aan de andere kant is het ook mogelijk dat het veranderende milieu van de lesionale atopische

huid van eczeempatiënten misschien wel een goed micro-milieu en substraat is voor specifieke *Staphylococcus*-soorten. Atopisch eczeem is gerelateerd aan een verstoorde huidbarrière, een defect immuunsysteem, en *S. aureus*-kolonisatie en -infecties. [9] Dus de vraag is of veranderingen in een huidmicrobioom kunnen leiden tot deze ontstekingsziekte van de huid, of dat kolonisatie door *Staphylococcus*-species mogelijk is ten gevolge van de veranderde huidomstandigheden bij eczeem? Ofwel, het verhaal van de kip of het ei.

Dit brengt ons bij het microbiomonderzoek dat de afgelopen jaren in Nijmegen is uitgevoerd. Omdat de buitenste laag van de opperhuid een vitale barrière voor het milieu is, hebben we ons de vraag gesteld of mutaties in huidbarrièregenen de microbiotasamenstelling van de menselijke huid en de cutane afweerreactie van de gastheer kunnen beïnvloeden. Filaggrine-nul allelen veroorzaken de huidziekte ichthyosis vulgaris en predisponeren voor het ontwikkelen van atopisch eczeem. [10] Wanneer filaggrine wordt afgebroken in de bovenste epidermale laag, dient het als de belangrijkste bron van zogenaamde natuurlijke hydraterende factoren (*Natural Moisturizing Factors*), die ervoor zorgen dat de buitenste lagen van het stratum corneum gehydrateerd blijven. [11] We hebben onderzocht of filaggrinedeficiëntie de microbiotasamenstelling van niet-eczemateuze huid van ichthyosis-vulgarispatiënten beïnvloedt. Met behulp van 16S *amplicon sequencing* en specifieke bio-informatica werd een significant effect van filaggrinedeficiëntie

¹ Senior Onderzoeker, afdeling Dermatologie, Laboratorium voor Experimentele Dermatologie, Radboud Institute for Molecular Life Sciences (RIMLS), Radboudumc, Nijmegen

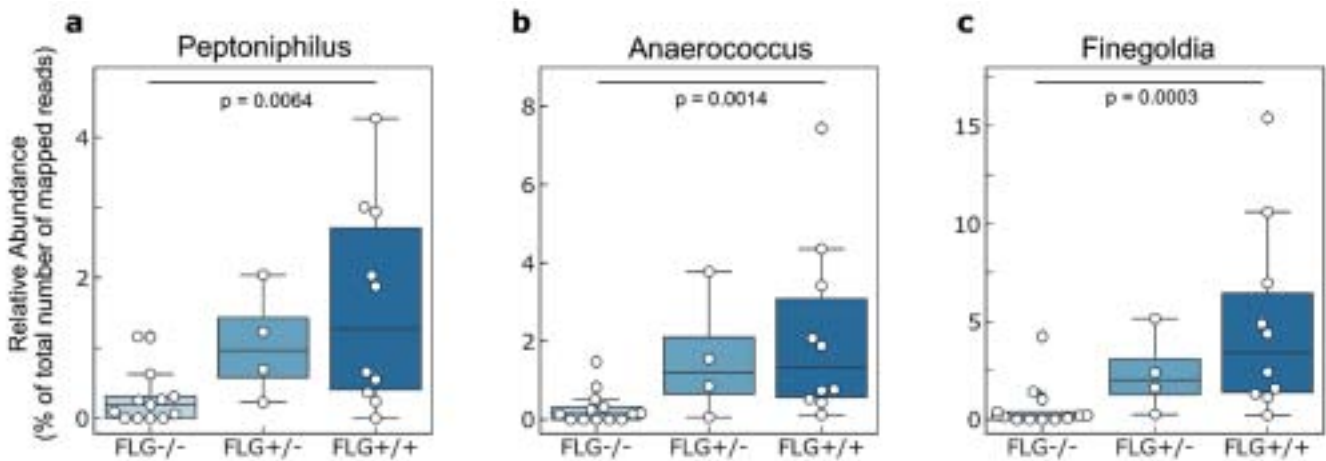
² Bioinformaticus, Center for Molecular and Biomolecular Informatics (CMBI), Radboudumc, Nijmegen

³ PhD-student, afdeling Dermatologie, Laboratorium voor Experimentele Dermatologie, Radboud Institute for Molecular Life Sciences (RIMLS), Radboudumc, Nijmegen

⁴ PhD-student, afdeling Dermatologie, Laboratorium voor Experimentele Dermatologie, Radboud Institute for Molecular Life Sciences (RIMLS), Radboudumc, Nijmegen

⁵ Emeritus Hoogleraar, afdeling Dermatologie, Laboratorium voor Experimentele Dermatologie, Radboud Institute for Molecular Life Sciences (RIMLS), Radboudumc, Nijmegen

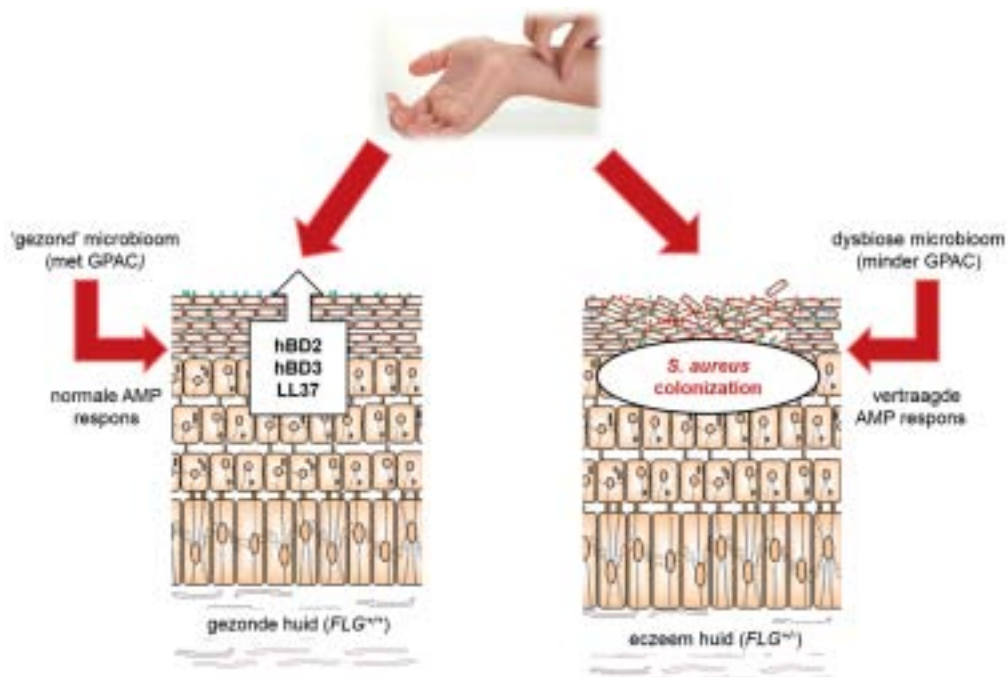
⁶ Hoofd Laboratorium, afdeling Dermatologie, Laboratorium voor Experimentele Dermatologie, Radboud Institute for Molecular Life Sciences (RIMLS), Radboudumc, Nijmegen



Figuur 1. Lagere relatieve hoeveelheid proteolytische GPAC op filaggrinedeficiënte huid. Verschillen in relatieve abundantie tussen 'FLG+/+' (n=10) en 'FLG-/-' (n=13) genotypen voor (a) *Peptoniphilus*-, (b) *Anaerococcus*-, en (c) *Finegoldia*-bacteriën. Horizontale lijnen geven significante verschillen aan (mann-whitney-U-test). 'FLG+/-' individuen (n=4) laten een dosiseffect zien (een trend maar niet significant door de te kleine groep). Afbeelding gemaakt met Instant Clue Software. [15]

op de samenstelling van de aanwezige microbiota gevonden, met name een lagere relatieve hoeveelheid proteolytische grampositieve anaerobe kokken (bekend als GPAC) (figuur 1). [12] Deze bacteriën omvatten de geslachten *Finegoldia*, *Anaerococcus* en *Peptoniphilus* en zijn peptinofiele microben. Peptonen zijn afbraakproducten die vrijkomen bij de hydrolyse van eiwitten en we veronderstelden daarom dat de afbraakproducten van filaggrine voedsel zou kunnen zijn voor deze bacteriën. Met behulp van een recent ontwikkeld in-vitro-stratum corneum-model, waarin callus (eelt van de voet) als voedingsbron wordt gebruikt, is de groei van de GPAC-stam *Finegoldia magna* onderzocht. [13] We hebben vastgesteld dat callus afkomstig van filaggrinedeficiënte patiënten een minder gunstig substraat is voor deze bacteriën, in vergelijking met callus van gezonde personen die een normale filaggrine-eiwitex-

pressie lieten zien. [12] Door deze associatie van verminderde GPAC-aanwezigheid op de huid in relatie tot filaggrine-expressie is er nieuw onderzoek gestart naar de mogelijke (causale) rol van GPAC in de pathogenese van eczeem. Er is onderzocht wat de effecten zijn van deze bacteriën op de immuunafweermechanismen van de gastheer en de samenstelling van het huidmicrobioom. Humane primaire keratinocytenmonolagen, 3D-epidermale constructen en mononucleaire cellen uit perifeer bloed (PBMCs) zijn gestimuleerd met een breed panel van levende en hittegedode huidbacteriën. Zo is er experimenteel vastgesteld dat GPACs als een alarmsignaal kunnen fungeren en ook betrokken zijn bij de afweer van de gastheer. GPACs kunnen immuuncellen stimuleren om cytokines af te scheiden die op hun beurt keratinocyten kunnen triggeren om antimicrobiële peptiden uit te scheiden. GPACs kunnen ook



Figuur 2. Biologische consequenties voor atopisch eczeem. Snelle inductie van antimicrobiële peptiden (AMP) door GPAC kan een belangrijk signaalmechanisme voor de keratinocyten zijn wanneer de huidbarrière wordt doorbroken (door bijvoorbeeld krabben) en deze commensale bacteriën in close contact komen met de epidermale keratinocyten. Volledige of gedeeltelijke afwezigheid van GPAC kan dan leiden tot een verminderde of vertraagde AMP-respons bij personen met filaggrinemutaties.

direct keratinocyten stimuleren om antimicrobiële peptiden te produceren. Als gevolg hiervan kunnen deze gastheereigen antimicrobiële moleculen de kolonisatie en infectie van *S. aureus* remmen (van der Krieken et al. manuscript in voorbereiding). Concluderend kunnen we stellen dat we nieuwe en potentieel belangrijke biologische aspecten van een veel voorkomend genetisch polymorfisme hebben ontdekt. Deze gegevens kunnen biologische gevolgen hebben voor atopisch eczeem. De waargenomen snelle inductie van antimicrobiële peptiden door GPAC suggereert dat dit een belangrijk signaalmechanisme voor de keratinocyten kan zijn wanneer de huidbarrière wordt doorbroken en een commensale bacterie in nauw contact komt met de epidermale keratinocyten. Volledige of gedeeltelijke afwezigheid van GPACs kan dan vermindert of vertraagd gevaar signaleren voor de keratinocyten bij personen met filaggrinmutaties waardoor deze eerder vatbaar zijn voor *S. aureus*-kolonisatie en -infectie (figuur 2).

Voor dit onderzoek is tevens een in-vitro-3D infectie/kolonisatiemodel ontwikkeld waarop enkele bacteriestammen of hele huidmicrobiomen kunnen worden aangebracht, (Rikken et al. manuscript in voorbereiding). In toekomstige experimenten zal dit model gebruikt worden om nieuwe antibiotica te testen. Bijvoorbeeld nieuwe stoffen die alleen de ziekteverwekker aanvallen en de goede commensalen niet doden, om te zien of we prebiotica kunnen gebruiken om 'goede' bacteriën te promoten en daarmee 'slechte' micro-organismen te verdrijven, of op probiotische wijze door levende 'goede' organismen toe te voegen aan een 'ziek' microbiom. [14]

LITERATUUR

1. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16:143-55.
2. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JJ, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009;326:1694-7.
3. Grice EA, Kong HH, Conlan S, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 2009;324:1190-2.
4. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012;13:260-70.
5. Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J. The skin microbiota. In Nibali I, Henderson B (Ed.) *The human microbiota and chronic disease - dysbioses as a cause of human pathology*. Wiley Blackwell, 2016: 81-94.
6. Zeeuwen PL, Kleerebezem M, Timmerman HM, Schalkwijk J. Microbiome and skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;13:514-20.
7. Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1974;90:525-30.
8. Kong HH, Oh J, Deming C, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res* 2012;22:850-9.
9. Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:1.
10. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006;38:441-6.
11. Brown SJ, McLean WH. One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol* 2012;132:751-62.
12. Zeeuwen PL, Ederveen TH, van der Krieken DA, et al. Gram-positive anaerobe cocci are underrepresented in the microbiome of filaggrin-deficient human skin. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:1368-71.
13. van der Krieken DA, Ederveen TH, van Hijum SA, et al. An in vitro model for bacterial growth on human stratum corneum. *Acta Derm Venereol* 2016;96:873-9.
14. Maguire M, Maguire G. The role of microbiota, and probiotics and prebiotics in skin health. *Arch Dermatol Res* 2017;309:411-21.
15. Nolte H, MacVicar TD, Tellkamp F, Kruger M. Instant clue: a software suite for interactive data visualization and analysis. *Sci Rep* 2018; 8:12648.

SAMENVATTING

Een decennium geleden startten wetenschappers het onderzoek naar de microbiële gemeenschappen in en op ons lichaam, ook wel het humane microbiom genoemd. Men dacht dat een beter zicht op de microbiële compositie en functie van die micro-organismen zou kunnen leiden tot een betere ziektediagnostiek, behandeling en preventie. Ook bij veelvoorkomende huidziekten zijn huidmicrobiota, en dan met name veranderingen in de samenstelling hiervan (ofwel: dysbiose), in verband gebracht met de pathogenese van deze aandoeningen. Microbiomstudies vinden echter in principe alleen correlaties en associaties, terwijl causale relaties hiermee niet rechtstreeks kunnen worden opgehelderd. In dit artikel wordt een studie aanpak gegeven hoe van associatie naar causaliteit te gaan, met een specifieke focus op huid (micro)biologie.

TREFWOORDEN

huidmicrobiota – atopisch eczeem – ichthyosis – filaggrine – grampositieve anaerobe kokken

SUMMARY

A decade ago, scientists started researching human microbial communities that are present at specific body sites, also known as the human microbiome. It was presumed that more knowledge of our microbiome would lead to more effective ways to diagnose, treat and eventually prevent diseases. Skin microbiota, and in particular changes in its composition (called dysbiosis), have also been associated with the pathogenesis of common skin diseases. It should be pointed out that microbiome studies can in principle only find correlations and associations, and cannot directly elucidate causal relations. In this article, a study approach is given to potentially move from association to causality, with specific focus to skin (micro)biology.

KEYWORDS

skin microbiota – atopic dermatitis – ichthyosis – filaggrin – gram-positive anaerobe cocci

CORRESPONDENTIEADRES

Patrick Zeeuwen

E-mail: patrick.zeeuwen@radboudumc.nl