



Het huidmicrobioom: van associatie naar functie en causaliteit

D.A. van der Krieken¹, G. Rikken², P.L.J.M. Zeeuwen³, E.H. van den Bogaard⁴

Het huideigen (commensale) microbioom beschermt tegen kolonisatie door microben uit de omgeving, en interacteert met cellen van de gastheer om invasie van (pathogene) microben tegen te gaan. Commensale huidbacteriën dragen bij aan de afweer door de productie van bacteriële antimicrobiële moleculen (bacteriocines), maar ook door simpelweg ruimte in te nemen waardoor pathogene micro-organismen niet kunnen koloniseren. Contact tussen microben en epidermale keratinocyten kan resulteren in de productie van antimicrobiële peptiden (AMPs) en/of activatie van in de huid aanwezige immuuncellen en een daaropvolgende productie van bijvoorbeeld cytokines en chemokines. Commensale microben kunnen ook samenwerken met huidcellen in de afweer tegen pathogene microben, bijvoorbeeld door de werking van elkaars AMPs/bacteriocines te versterken. Steeds vaker wordt dysbiose (een veranderde samenstelling van het microbioom) gerelateerd aan ziekte, zo ook bij huidziektes zoals atopisch eczeem en psoriasis.

MICROBIOOM DYSBIOSE BIJ HUIDZIEKTEN

De samenstelling van het humane huidmicrobioom is afhankelijk van verschillende factoren. Zo kan de conditie van de huid, de lichaamslocatie, genetische factoren van de gastheer en omgevingsfactoren een invloed hebben op de microbiële samenstelling. Een voorbeeld hiervan is dysbiose, gekenmerkt door kolonisatie en infectie met *Staphylococcus aureus* bacteriën bij atopisch eczeempatiënten. Deze patiënten hebben een verstoorde barrièrefunctie van de huid, een verminderde AMP productie, en een ontregelde afweerreactie. Bij psoriasis is er sprake van een versnelde differentiatie van keratinocyten en een pro-inflammatoire cytokine-omgeving die leidt tot een overproductie aan AMPs in de epidermis. Huidinfecties worden zelden gezien in onbehandelde psoriasis. Een dominantie van specifieke bacteriële species zoals bij atopisch eczeem is tot nu toe in psoriasis niet gevonden. [1] Bij andere chronisch inflammatoire huidziekten, o.a. acne vulgaris, hidradenitis suppurativa en rosacea, is microbioom dysbiose wel evident. [2] Echter wat de functionele consequenties zijn van deze verandering in microbiële samenstelling op de huid is een onderbelicht onderwerp van onderzoek. Naast de beschrijvende studies waarin associaties gerapporteerd worden, zijn functionele studies noodzakelijk om een vertaalslag te maken van associatie naar causaliteit en om ons begrip van de relatie tussen microbe en gastheer te vergroten (figuur 1).

EXPERIMENTELE STUDIES NAAR HUID-MICROBE INTERACTIES

Experimentele humane modellen om huid-microbe interacties te bestuderen zijn schaars. De ontwikkeling van dergelijke

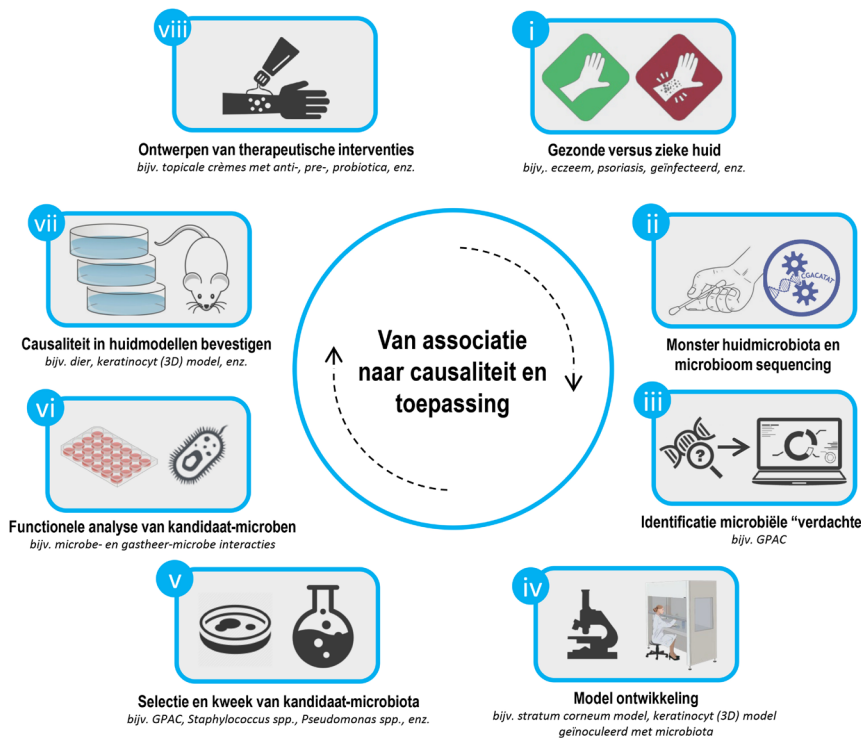
alternatieven voor traditionele proefdierstudies wordt bemoeilijkt door de moeizame 'relatie' tussen bacteriën en cel- en weefselkweekmodellen. Van oudsher stellen onderzoekers alles in werking om de aanwezigheid van microben in celkweek tegen te gaan. Gebruik van antibiotica in celkweekmedium is standaardpraktijk, aseptische technieken en steriele lamellaire flowkasten voorkomen dat cellen 'besmet' raken. Studies met levende bacteriën of schimmels zijn kortdurend van aard omdat de gastheer (bijv. keratinocyten) ten dode zijn opgeschreven door de exponentiele microbiële groei, depletie van nutriënten, en uitscheiding van toxines in het kweekmedium. In 2016 presenteerden wij een huidmodel waarin geen levende keratinocyten aanwezig zijn, maar wel het *stratum corneum* dat als groeisubstraat gebruikt kan worden om de interactie tussen microben te bestuderen (bijv. commensale *versus* pathogenen bacteriën). [3] In de afgelopen 5 jaar is een nieuw huidmodel ontwikkeld in ons laboratorium waarin huidorganoïden (ofwel humane epidermale equivalenten) op gecontroleerde wijze topicaal blootgesteld worden aan levende bacteriën en schimmels, waarbij de interacties en effecten daarvan gedurende een 'co-culture' periode tot aan twee weken bestudeerd kunnen worden. (Rikken et al. manuscript submitted) De ontwikkeling van dergelijke complexe 3D huid-microbioom modellen waarin de interactie van levende microben met huidcellen onderzocht kan worden, is van cruciaal belang om moleculair mechanismen op te helderen en causale relaties te identificeren. Tevens biedt het een platform voor het testen en ontwikkelen van specifieke microbioom modulerende therapieën, zoals pre- of probiotica of smalspectrum antibiotica. [4] Deze experimentele model-

¹ Onderzoeker in opleiding, afdeling Dermatologie, Radboudumc, Nijmegen

² Onderzoeker in opleiding, Radboudumc, afdeling Dermatologie, Nijmegen

³ Wetenschappelijk onderzoeker, afdeling Dermatologie, Radboudumc, Nijmegen

⁴ Hoogleraar, hoofd Laboratorium voor Experimentele Dermatologie, afdeling Dermatologie, Radboudumc, Nijmegen



Figuur 1. De route van associatie naar causaliteit middels functionele experimentele studies. i. Gezonde versus zieke huid wordt geëvalueerd, met vermoedelijke betrokkenheid van het microbioom. ii. Huidmonsters worden verzameld via standaardprotocollen en worden gesequenced. iii. Identificatie van 'verdachte' microben met beschikbare bio-informatica pijplijnen. iv. Ontwikkeling van experimentele (in vitro) modellen die geschikt zijn voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag. v. Microbiële kandidaten worden geselecteerd en gekweekt. vi. Functionele analyse van kandidaat-microben en de interactie met gastheercellen. vii. Bevestiging van microbiota-geassocieerde effecten van initiële onderzoeksbevindingen in relevante in vitro of in vivo (ziekte) modellen. viii. Toepassingen op basis van onderzoeksresultaten o.a. therapeutische interventies voor de behandeling van huidaandoeningen.

len hebben ons in staat gesteld om de functie van specifieke huidcommensale bacteriën, die verminderd aanwezig zijn op de filaggrine-deficiënte huid (ichthyosis vulgaris en atopisch eczeempatiënten) [5] te onderzoeken. De resultaten van deze studie zijn hieronder samengevat.

GRAMPOSITIEVE ANAEROBE COCCEN (GPAC): HOEDERS VAN DE HUIDBARRIÈRE

Zogeheten 'loss-of-function' mutaties in het *filaggrine* (FLG) gen leiden bij ichthyosis vulgaris patiënten tot een extreem droge huid. [6] Uit ons onderzoek blijkt dat lagere hoeveelheden van de 'natural moisturizing factor' (NMF, een afbraakproduct van filaggrine) in het *stratum corneum* van personen met ichthyosis vulgaris resulteert in een andere samenstelling van de huidmicrobiota. Met name de grampositieve anaerobe coccen (GPAC) zijn minder aanwezig in het huidmicrobiom van ichthyosis vulgaris patiënten. Aanvullende analyses toonden aan dat bacteriën die NMF kunnen gebruiken als voedingsbron in mindere mate aanwezig waren. De afwezigheid van filaggrine in de huid van ichthyosis vulgaris patiënten blijkt dus te leiden tot een veranderde microbiota samenstelling. Om deze aanname met experimenteel onderzoek te bevestigen hebben we gebruik gemaakt van het *in vitro stratum corneum* model. We vonden dat GPAC minder goed groeiden op *stratum corneum* van ichthyosis vulgaris patiënten ten opzichte van eelt afkomstig van gezonde vrijwilligers (personen zonder *FLG* mutaties). [5]

Aangezien lage niveaus van het filaggrine eiwit correleren met het risico op atopisch eczeem [7], veronderstelden wij dat de lagere hoeveelheid aan GPAC op huid mogelijk betrokken is bij het ziekteproces via microbe-microbe of microbe-gastheer interacties. In de jaren na de beschrijving

van de GPAC-geassocieerde dysbiose in 2017, hebben we de mogelijke rol van GPAC in de pathogenese van atopisch eczeem uitgebreid onderzocht [8]. Rechtstreeks contact van GPAC met *Staphylococcus aureus*, of de productie van actieve metabolieten door GPAC bleek niet van invloed op de groei of virulentie van dit pathogeen. Echter, direct contact van GPAC met keratinocyten in monolaag celkweken resulteerde in een sterke en snelle inductie van AMPs, waarvan bekend is dat deze de groei van *Staphylococcus aureus* kunnen remmen. De aanwezigheid en groei van GPAC op het *stratum corneum* van de nieuw ontwikkelde 3D huidmicrobiom organoïden induceerde ook een AMP response in keratinocyten.

ACTIVATIE VAN DE 'TEERZALF-RECEPTOR' DOOR MICROBEN

Door voorkennis uit eerder uitgevoerde studies zagen wij een mogelijke rol voor de aryl koolwaterstofreceptor (AHR) in deze inductie van AMPs door GPAC in keratinocyten. De AHR kennen wij uit ons onderzoek naar het werkingsmechanisme van teerzalf [9] en de daaropvolgende studies naar de biologische processen in de huid die onder controle staan van deze receptor [10], en het microbiom onderzoek met teer-behandelde atopisch eczeempatiënten en gezonde vrijwilligers. [11] Recent is een nieuwe topicale behandeling voor psoriasis goedgekeurd (trials met atopisch eczeempatiënten zijn gaande) met een AHR-targeted geneesmiddel (Tapinarof). [12] De AHR is een (in keratinocyten en andere huidcellen) aanwezige transcriptiefactor die geactiveerd kan worden door een variëteit aan liganden (van aromatische koolwaterstoffen tot tryptofaan metabolieten die door microben of humane cellen gemaakt worden). Receptoractivatie leidt tot een verhoogde aanmaak van eiwitten (waaronder filaggrine) die belangrijk zijn voor de barrièrefunctie van de huid, en

dempt diverse onstekingsprocessen in de huid. [13] In diverse celkweekexperimenten vonden wij dat GPAC inderdaad in staat zijn om de AHR-sigtaalroute te activeren in keratinocyten. Gaschromatografie analyse van GPAC lysaten toonde de aanwezigheid van indolen aan. Indolen zijn tryptofaan metabolieten die bekend staan als AHR liganden. Echter, AHR signalering in de keratinocyt bleek geen rol te spelen in de antimicrobiële afweerreactie geïnitieerd door GPAC. Wel was de expressie van huidbarrière-genen onder invloed van GPAC AHR afhankelijk.

Andere geteste huidbacteriën *Staphylococcus epidermidis* en *Cutibacterium acnes* (beiden commensalen) en ook *Staphylococcus aureus* (pathogeen) hadden geen effect op de keratinocyten in deze proefopzet, hetgeen een specifieke rol voor GPAC in het microbioom suggereert. GPAC zouden kunnen dienen als een 'alarmeringssignaal' in geval van een defecte huidbarrière om een snelle afweerreactie van de gastheer in gang te kunnen zetten. In het geval van atopisch eczeem is de barrière integriteit van de huid vaak slechter, waardoor de levende cellen van de epidermis meer toegankelijk zijn voor microbiële componenten. Afgaande op onze experimentele data, veronderstellen wij dat huid met minder GPAC een minder snelle en ook lagere AMP afweerrespons zal vertonen bij beschadiging (bijvoorbeeld door krabben vanwege de jeuk). Hierdoor kan *Staphylococcus aureus* de huid gemakkelijker koloniseren en infecteren zoals vaak gezien wordt bij lesionale huid van atopisch eczeem.

CONCLUSIE EN DISCUSSIE

Veel (inflammatoire) huidziekten vertonen een samenspel van microbiële en patiënt-specifieke factoren die betrokken zijn bij de pathogenese. Deze interactie is dusdanig diepgaand dat de initiële boosdoener moeilijk aan te wijzen is. In atopisch eczeem kan dysbiose tot ziekte leiden, aangezien *Staphylococcus aureus* de barrièrefunctie kan verstoren, de AMP-productie kan verminderen en de ziekte-specifieke immuunrespons kan moduleren. Daarentegen biedt de huid *Staphylococcus aureus* de mogelijkheid om te gedijen, door verminderde niveaus van aanwezige filaggrine (resultierend in verminderde niveaus van beschermende microben, AMPs, hydratatie en barrièrefunctie). Daarmee is de vraag of dysbiose tot ziekte leidt of vice versa nog niet beantwoord. Wel kunnen we concluderen dat een gebalanceerd divers microbioom veel gunstige effecten heeft en de ernst van de ziekte kan verminderen door het uitroeien van ziekteverwekkers, de epidermale barrière te herstellen en een adequate immuunrespons op te wekken. Geen wonder dat te midden van het

TREFWOORDEN

Microbioom – epidermis – huidbarrière - grampositieve anaerobe cocen - 3D huidmodellen

BELANGENVERSTRENGELING

De auteurs hebben geen (financiële) belangenverstrengeling.

oerwoud aan huidproducten met een zogeheten 'microbiome friendly claim', ook de ontwikkeling van microbiom-modulerende therapieën in de aandacht staat. Of dit haalbare alternatieven zijn voor conventionele topische middelen of het huidige scala aan succesvolle immuun-modulerende therapieën zal de toekomst moeten uitwijzen.

LITERATUUR

1. Fyhrquist N, Muirhead G, Prast-Nielsen S, Jeanmougin M, Olah P, Skoog T, et al. Microbe-host interplay in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat Commun.* 2019;10(1):4703.
2. Ederveen TH, Smits JP, Boekhorst J, Schalkwijk J, van den Bogaard EH, Zeeuwen PL. Skin microbiota in health and disease: From sequencing to biology. *J Dermatol.* 2020;47(10):1110-8.
3. van der Krieken DA, Ederveen TH, van Hijum SA, Jansen PA, Melchers WJ, Scheepers PT, et al. An in vitro model for bacterial growth on human stratum corneum. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(7):873-9.
4. Jansen PA, van der Krieken DA, Botman PN, Blaauw RH, Cavina L, Raaijmakers EM, et al. Stable pantothenamide biosisteres: novel antibiotics for Gram-positive bacteria. *J Antibiot (Tokyo).* 2019;72(9):682-92.
5. Zeeuwen PL, Ederveen TH, van der Krieken DA, Niehues H, Boekhorst J, Kezic S, et al. Gram-positive anaerobic cocci are underrepresented in the microbiome of filaggrin-deficient human skin. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(4):1368-71.
6. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet.* 2006;38(3):337-42.
7. Wong X, Denil S, Foo JN, Chen H, Tay ASL, Haines RL, et al. Array-based sequencing of filaggrin gene for comprehensive detection of disease-associated variants. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(2):814-6.
8. van der Krieken DA, Rikken G, Ederveen TH, Jansen PA, Rodijk-Olthuis D, Meesters LD, et al. Gram-positive anaerobic cocci guard skin homeostasis by regulating host-defense mechanisms. *iScience.* 2023;26(4):106483.
9. van den Bogaard EH, Bergboer JG, Vonk-Bergers M, van Vlijmen-Willems IM, Hato SV, van der Valk PG, et al. Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2013;123(2):917-27.
10. van den Bogaard EH, Podolsky MA, Smits JP, Cui X, John C, Gowda K, et al. Genetic and pharmacological analysis identifies a physiological role for the AHR in epidermal differentiation. *J Invest Dermatol.* 2015;135(5):1320-8.
11. Smits JP, Ederveen TH, Rikken G, van den Brink NJ, van Vlijmen-Willems IM, Boekhorst J, et al. Targeting the cutaneous microbiota in atopic dermatitis by coal tar via AHR-dependent induction of antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol.* 2020;140(2):415-24 e10.
12. Lebwohl MG, Stein Gold L, Strober B, Papp KA, Armstrong AW, Bagel J, et al. Phase 3 trials of tapinarof cream for plaque psoriasis. *N Engl J Med.* 2021;385(24):2219-29.
13. van den Bogaard EH, Esser C, Perdew GH. The aryl hydrocarbon receptor at the forefront of host-microbe interactions in the skin: A perspective on current knowledge gaps and directions for future research and therapeutic applications. *Exp Dermatol.* 2021;30(10):1477-83.

CORRESPONDENTIEADRES

Ellen van den Bogaard

E-mail: ellen.vandenbogaard@radboudumc.nl