

Chapter ten

Nederlandse samenvatting

Het immuunsysteem van de huid De vernuftige krijgsmacht van Langerhans cellen

10.1 Inleiding

De huid is het grootste orgaan van het menselijk lichaam en vormt de eerste barrière tegen schadelijke invloeden van buitenaf. Deze natuurlijke barrière kan beschadigd raken door blootstelling aan chemicaliën wat kan leiden tot contact dermatitis.

Contact dermatitis is een veel voorkomend gezondheidsprobleem, bij zowel mannen als vrouwen. Er kunnen twee soorten contact dermatitis onderscheiden worden, te weten: allergische- en irritant- contact dermatitis. Tijdens een allergische reactie, wordt het afweersysteem van het lichaam geactiveerd. De klinische kenmerken zijn: jeuk, roodheid, zwelling van de huid met vorming van papeltjes, blaasjes en bij een zeer heftige reactie soms zelfs blaarvorming. Een irritatie reactie geeft in beginsel hetzelfde klinische beeld, maar het onderliggende mechanisme is echter anders. Omdat, met name, een allergische reactie kan leiden tot ernstige gezondheidsproblemen, is het van groot belang dat potentiële allergenen gedetecteerd worden alvorens ze in een product worden verwerkt. Momenteel zijn dergelijke testen gebaseerd op proefdieren. Echter in de nabije toekomst is het gebruik van proefdieren binnen de Europese Unie niet langer toegestaan om cosmetische producten te testen. Daarom is er een grote noodzaak om nieuwe dierproefvrije testen te ontwikkelen die potentiële allergenen kunnen onderscheiden.

10.1.1 Langerhans cellen

In de menselijke huid bevinden zich cellen van het afweersysteem (immuunsysteem). De huid is opgebouwd uit 3 lagen: de opperhuid (epidermis), de lederhuid (dermis), en het onderhuids bindweefsel (vetlaag). In de epidermis liggen Langerhans cellen (LC). Dit zijn antigen presenterende cellen, welke betrokken zijn bij de inductie van een immuunreactie. Bij het binnendringen van de huid nemen LC de lichaamsvreemde stoffen op en migreren door de huid naar de lymfeklieren, waar zij de lichaamsvreemde stof presenteren aan T cellen. De T cellen zijn betrokken bij de specifieke afweer van het lichaam tegen de lichaamsvreemde stof.

LC migreren onder invloed van een chemokine gradiënt. Cellen in de dermis en van het lymfestelsel scheiden chemokines uit, welke gerichte migratie van LC bewerkstelligen. Om een specifieke immuunreactie te kunnen induceren, moeten LC een uiterlijke (fenotypische) veranderingen ondergaan. Ze differentiëren van een cel die gespecialiseerd is in het opnemen van lichaamsvreemde stoffen (antigenen), in een cel die gespecialiseerd is in het presenteren van antigenen aan T cellen. Dit proces heet maturatie. Als gevolg hiervan verandert de samenstelling van eiwitten op het celoppervlak, zoals toename van de eiwitten CD83, CD86, CXCR4 en CCR7. Daarnaast worden er ook andere eiwitten uitgescheiden door de cel, zoals IL-1beta en CXCL8.

10.2 Resultaten

In **hoofdstuk 2** wordt beschreven hoe LC uit de epidermis migreren naar de dermis onder invloed van allergenen. Resthuid van buikwandreductie operaties werd 16 uur blootgesteld aan 3 allergenen. De LC in die huid werden vervolgens aangekleurd en hun positie bepaald. Resultaten laten zien dat LC naar de dermis migreren. De betrokken chemokine voor de aantrekking van LC uit de epidermis, blijkt CXCL12 te zijn. Dit chemokine wordt na blootstelling aan stressfactoren in de dermis aangemaakt door onder andere fibroblasten. LC matureren na blootstelling aan allergenen, maar niet na blootstelling aan irriterende stoffen, en krijgen als gevolg daarvan de receptor (CXCR4) voor CXCL12 op hun celmembraan. Om de migratie van LC meer in detail te bestuderen, hebben we gebruik gemaakt van een cellijn (MUTZ-3) die differentieerbaar is tot LC. Deze MUTZ-LC werden al dan niet blootgesteld aan allergenen voor 16 uur. Vervolgens konden de MUTZ-LC naar dermale fibroblasten migreren. Deze migratie naar fibroblasten toe was significant hoger na blootstelling van MUTZ-LC aan allergenen vergeleken met niet blootgestelde MUTZ-LC. Deze migratie als gevolg van allergenblootstelling, was volledig te remmen door fibroblasten in aanwezigheid van neutraliserende antilichamen tegen CXCL12 te kweken of MUTZ-LC te laten migreren in aanwezigheid van neutraliserende antilichamen tegen CXCR4

(CXCL12 receptor). Deze resultaten werden bevestigd in experimenten met resthuid. Neutraliserende antilichamen tegen CXCL12 werden ingespoten in de dermis. Dit zorgde ervoor dat er na blootstelling aan allergenen geen migratie van LC naar de dermis meer plaatsvond. In deze studie werd ook de invloed van 2 andere chemokines (CCL19 en CCL21) op de migratie van LC bestudeerd. CCL19 en CCL21 werden eerder beschreven als essentieel voor de migratie van LC naar de lymfeklieren. Echter injectie van de huid met neutraliserende antilichamen tegen deze twee chemokines, remde de migratie naar de dermis niet af. Deze resultaten duiden op een belangrijke rol voor CXCR4-CXCL12 interacties, tijdens de migratie van LC uit de epidermis naar de dermis om zo de verdere reis naar de lymfeklieren, onder invloed van CCL19 en CCL21 mogelijk te maken.

Hoofdstuk 3 bestudeert ook migratie van LC, alleen na blootstelling aan irriterende stoffen. Irriterende stoffen induceren geen specifieke immuunreactie in het lichaam, maar de irritatie reactie kan wel tot vergelijkbare klachten leiden (bijv. jeuk en uitslag). In deze studie werd resthuid 16 uur blootgesteld aan 7 verschillende irriterende stoffen. LC migreren uit de epidermis naar de dermis, maar niet via het CXCR4-CXCL12 mechanisme zoals is beschreven in hoofdstuk 2. Migratie van LC uit de epidermis na blootstelling van de huid aan stressfactoren (zoals allergenen en irriterende stoffen) is TNF-alpha afhankelijk. TNF-alpha is een cytokine dat wordt uitgescheiden door cellen in de epidermis na blootstelling van de huid aan stressfactoren. Als gevolg hiervan scheiden dermale cellen (zoals fibroblasten) verschillende chemokines uit, waaronder CXCL12, CCL2 en CCL5. Injectie van de huid met neutraliserende antilichamen tegen CCL2 en CCL5 resulteerde in een volledige remming van LC migratie naar de dermis na blootstelling aan irriterende stoffen. Deze resultaten duiden erop dat na blootstelling aan irriterende stoffen, de TNF-alpha induceerbare chemokinen CCL2 en CCL5 een belangrijke rol spelen in de migratie van LC uit de epidermis naar de dermis.

In **hoofdstuk 4** wordt bestudeerd wat er met gemigreerde LC in de dermis gebeurt na blootstelling aan irriterende stoffen. Het is bekend dat LC na blootstelling aan allergenen, door de dermis migreren naar de lymfeklieren om daar specifieke afweercellen (T cellen) te stimuleren tot een immuunreactie. Omdat na blootstelling aan irriterende stoffen geen immuunreactie optreedt, is het nut van LC migratie uit de epidermis naar de dermis onduidelijk. LC en macrofagen (een ander type antigen presenterende cel in de huid) in de huid werden aangekleurd na blootstelling (16 uur) van resthuid aan 7 irriterende stoffen. Opvallend was dat er na blootstelling van resthuid aan irriterende stoffen significant meer macrofaagachtige cellen te vinden waren in de dermis. Deze toename was recht evenredig met de afname van het aantal LC in de huid. Omdat de resthuid een gesloten systeem is (d.w.z. dat er geen nieuwe cellen vanuit het bloed aangevoerd kunnen worden), lijkt het erop dat deze 'nieuwe macrofagen' afkomstig zijn van de gemigreerde LC. Resultaten van een eerdere, oncologische studie toonden aan dat er een transitie van LC naar macrofaagachtige cellen plaatsvindt in een tumor omgeving (deze omgeving is rijk aan het cytokine IL-10). Om uit te zoeken of tijdens een irritatie reactie, IL-10 ook een rol speelt in de post-migratoire verandering van LC naar macrofaagachtige cellen, werd resthuid ingespoten met neutraliserende antilichamen tegen IL-10. Vervolgens werd deze huid voor 16 uur blootgesteld aan irriterende stoffen en LC en macrofagen aangekleurd. Transitie van LC naar macrofaagachtige cellen werd in aanwezigheid van neutraliserende antilichamen tegen IL-10 volledig geremd. Deze resultaten onthullen een IL-10 afhankelijke post-migratoire verandering van LC in macrofaagachtige cellen na blootstelling aan irriterende stoffen.

De zoektocht naar alternatieve testen voor het identificeren van potentiële allergenen, om zo de huidige dierproeven te vervangen wordt momenteel enorm gestimuleerd. Mede omdat vanaf 2013, het gebruik van proefdieren voor cosmetische doeleinden verboden is binnen de EU. De bevindingen van hoofdstuk 2 en 3, worden in **hoofdstuk 5** gebruikt om een nieuwe methode te ontwikkelen om potentiële allergenen te kunnen onderscheiden van irriterende stoffen. Drie verschillende methodes om allergenen van irriterende stoffen te kunnen onderscheiden worden beschreven in dit hoofdstuk. Alle methodes zijn gebaseerd op de MUTZ-LC. De eerste methode beschrijft de expressie van CD86 (een eiwit op het celmembraan van LC dat wordt opgereguleerd na maturatie), welke theoretisch onder

invloed van allergenen opgereguleerd zou worden, maar niet onder invloed van irriterende stoffen. Helaas is deze meting niet zo robuust als wenselijk, en levert het een aantal vals positieve en vals negatieve resultaten op. De tweede methode focust op de secretie van CXCL8 (een chemokine) door LC na blootstelling aan allergenen en irriterende stoffen. Deze methode geeft een duidelijk onderscheid aan tussen allergenen en irriterende stoffen. CXCL8 werd significant meer uitgescheiden na blootstelling aan allergenen, vergeleken met blootstelling aan irriterende stoffen. De derde methode is gebaseerd op het migratie gedrag van LC. In hoofdstuk 2 werd beschreven dat LC na blootstelling aan allergenen naar CXCL12 migreren. In hoofdstuk 3 werd beschreven dat LC na blootstelling aan irriterende stoffen onder andere naar CCL5 migreren. Deze resultaten worden gecombineerd in 1 assay. MUTZ-LC werden al dan niet blootgesteld aan allergenen en irriterende stoffen voor 16 uur. Daarna konden de MUTZ-LC naar CXCL12 of CCL5 migreren. Resultaten laten een duidelijk verschil zien tussen allergenen en irriterende stoffen. LC blootgesteld aan allergenen migreren significant meer naar CXCL12, waar LC blootgesteld aan irriterende stoffen significant meer naar CCL5 migreren. Concluderend, de MUTZ-LC gebaseerde analyse van CXCL8 secretie en de MUTZ-LC gebaseerde migratie assay zijn veelbelovend om allergenen van irriterende stoffen te scheiden en hebben potentie om de huidige dierproef gebaseerde methodes te vervangen.

Hoofdstuk 6 tot en met 8 beschrijven de ontwikkeling van een huidmodel in kweekschaal, waarin de biologie van LC in meer detail kan worden bestudeerd. Deze modellen worden ontwikkeld met de focus op het vervangen van de huidige diermodellen om potentiële allergenen te kunnen identificeren. Het voordeel van deze modellen ten opzichte van de bovengeschreven assays, is dat een huidmodel alle facetten van het initiëren van een allergische reactie omvat (penetratie van de huid, beschikbaarheid van de allergenen voor de LC, interacties van LC met andere cellen in de huid, LC maturatie en migratie).

Hoofdstuk 6 beschrijft 2 manieren waarop de interactie tussen epidermale cellen (keratinocyten) en LC wordt bestudeerd. In het eerste deel van de studie werden epidermale huidkweken (bestaande uit keratinocyten) gemaakt in de bovenste well van een transwell system. In de onderste well werden dan wel MUTZ-3 cellen (voorloper cellen voor LC (ongedifferentieerde cellen)) of MUTZ-LC gekweekt. Vervolgens werden de epidermale huidkweken blootgesteld aan verschillende chemicaliën. Het phenotype van de MUTZ-3 of MUTZ-LC werd bepaald op aanwezigheid van maturatie markers (d.w.z. eiwitten op het celoppervlak die opgereguleerd worden na blootstelling aan allergenen, maar niet aan irriterende stoffen). Dit model maakt interactie mogelijk tussen keratinocyten en MUTZ-3/MUTZ-LC toe door middel van oplosbare factoren. In het tweede gedeelte van deze studie, werden MUTZ-LC ingebouwd in epidermale huidkweken, om zodoende directe cel-cel interactie tussen keratinocyten en MUTZ-LC te bewerkstelligen. Resultaten laten zien dat het mogelijk is om MUTZ-LC in de epidermis in te bouwen, en dat de verdeling van deze cellen in de epidermis vergelijkbaar is met de situatie in normale menselijke huid.

In hoofdstuk 2 en 3 toonden wij aan dat fibroblasten (en mogelijk andere dermale cellen) een belangrijke rol spelen in de migratie van LC uit de epidermis na blootstelling aan allergenen en irriterende stoffen. Daarom proberen wij in **hoofdstuk 7 en 8** dermale fibroblasten in een huidmodel in te bouwen. Om een goed en reproduceerbaar model te maken, hebben we in **hoofdstuk 7** eerst onderzocht welke factoren een rol spelen bij de transdermale aantrekking van MUTZ-LC door de epidermale cellen (keratinocyten). Wanneer we MUTZ-LC lieten migreren naar keratinocyten in aanwezigheid van neutraliserende antilichamen tegen CCL5 en CCL20, vond er geen migratie naar keratinocyten plaats. Deze resultaten ontrafelen een belangrijke rol voor de epidermis afkomstige chemokines CCL5 en CCL20, in de migratie van MUTZ-LC naar de epidermis van huidkweken. Helaas blijkt er een grote inter- en intra-donorafhankelijke variatie te zijn betreft de secretie van CCL5 en CCL20 door keratinocyten. Hierdoor is het huidmodel niet zo reproduceerbaar als gewenst. Om het huidmodel meer robuust te maken, hebben we daarom in **hoofdstuk 8** ervoor gekozen om de MUTZ-LC tegelijk met keratinocyten op een fibroblast-rijke dermale matrix in te zaaien. Hierdoor worden verschillen in migratieactiviteit van MUTZ-LC (door verschillen in uitscheiding van CCL5 en CCL20 door keratinocyten) voorkomen, omdat de MUTZ-LC dan

al op de juiste positie (in de epidermis) zitten. Dit model maakt het mogelijk dat er interactie tussen keratinocyten, MUTZ-LC en fibroblasten kan plaatsvinden. MUTZ-LC zijn gelijkmatig verdeeld in de epidermis van deze huidkweken en bleek zeer reproduceerbaar te zijn. In deze studie hebben we ook de functionaliteit van dit huidmodel getest. Zowel de migratie als de maturatie capaciteit van MUTZ-LC werd bestudeerd. Resultaten laten een vermindering van het aantal MUTZ-LC in de epidermis van het huidmodel zien, na blootstelling aan het allergeen nikkelsulfaat. Daarnaast werd ook de maturatie induceerbare cytokine IL-1beta uitgescheiden door MUTZ-LC en de maturatie induceerbare CCR7 expressie opgereguleerd op het celmembraan van MUTZ-LC door blootstelling aan dit maturerende allergeen. In conclusie, dit ontwikkelde huidmodel is zeer reproduceerbaar en functioneel en heeft daardoor veel potentie om in de toekomst dierproeven te vervangen om potentiële allergenen te identificeren. Behalve deze functie, kan het huidmodel ook heel nuttig zijn om huidgebaseerde vaccinatiestrategieën te testen en om LC biologie onder gecontroleerde omstandigheden te bestuderen.

10.3 Conclusie

De resultaten die in dit proefschrift gepresenteerd zijn, zijn niet alleen van groot belang in de zoektocht naar alternatieve methoden om potentiële allergenen te detecteren, maar ook voor LC biologie in het algemeen. Dit kan nieuwe inzichten voortbrengen en leiden tot LC gebaseerde therapieën voor contact dermatitis of zelfs kanker.