

VU Research Portal

Towards animal free testing: Human skin and gingiva organotypic models for the study of Langerhans Cell biology

Kosten, I.J.

2016

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Kosten, I. J. (2016). *Towards animal free testing: Human skin and gingiva organotypic models for the study of Langerhans Cell biology*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

7.1 NEDERLANDSE SAMENVATTING

Zoals de huid het hele externe oppervlak van het menselijk lichaam bedekt, zo bedekt het slijmvlies (mucosa) het hele interne oppervlak. Ze vormen samen de eerste barrière naar de buitenwereld en bieden bescherming aan interne weefsels tegen gifstoffen en ziekteverwekkers, en in het geval van de huid ook tegen ultraviolette (UV) straling. Naast dit alles hebben de orale mucosa (inclusief het tandvlees of gingiva) en de huid ook nog andere belangrijke functies zoals zintuiglijke waarneming (tast, druk, temperatuur), immunologische surveillance, thermoregulatie en de regeling van vochtverlies.

Huid en mucosa zijn beide volledig immunologisch competente weefsels die een rol spelen in de inductie en de effector fase van de immuun respons. Gereconstitueerde huid modellen die immuun effector cellen bevatten, zoals dendritische cellen (DC) en T cellen (beide van belang in de afweer tegen bacteriën en virussen, maar ook tegen tumoren), lijken unieke en veelzijdige mogelijkheden te bieden voor het bestuderen van onderliggende mechanismen die betrokken zijn bij de inductie van een immuun respons of van perifere tolerantie. Onderzoeksgroepen hebben in het verleden laten zien dat de interactie tussen keratinocyten, fibroblasten en verschillende DC subsets van groot belang is voor het tot stand komen van deze immuun responsen, dan wel immuun tolerantie. Met de op deze wijze verkregen kennis wordt het mogelijk om nieuwe behandelingen te ontwikkelen voor huidaandoeningen zoals allergieën, autoimmuunziekten en kanker.

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was de ontwikkeling van menselijke *in vitro* test modellen voor huid en orale mucosa die als een meer direct relevant alternatief zouden kunnen dienen voor dierproeven. Daar het uiteindelijke doel van het onderzoek was een vergelijking te maken tussen de immuun respons van huid en de mondholte (met een focus op de DC biologie in relatie tot allergische reacties) was het nodig een model te ontwikkelen met een grotere fysiologische relevantie dan de bestaande huid en gingiva modellen; het model moest ruimte bieden aan de interactie tussen de verschillende cel typen van de huid en het immuun systeem. In dit proefschrift beschrijven wij de ontwikkeling en het gebruik van een huid en tandvlees (gingiva) model, beide bestaand uit het bovenliggende epitheel en het onderliggende bindweefsel, met en zonder incorporatie van Langerhans cellen (LC) in het epitheel. LC zijn de DC van de opperhuid en het equivalente epitheel van de gingiva. Met behulp van deze modellen hebben we de biologie van de LC *in situ* kunnen bestuderen onder gecontroleerde *in vitro* omstandigheden. Dit stelde ons in staat om met name de migratie mechanismen van deze cellen in een vergelijkend onderzoek te ontrafelen in huid versus gingiva.

Allereerst was het nodig de rol van de cytokines en chemokines in de migratie van huid LC versus gingiva LC te bestuderen. We hebben ons in eerste instantie geconcentreerd op de

cytokines en chemokines die reeds in de huid waren geïdentificeerd als hoofdrolspelers in het induceren en reguleren van LC migratie en hebben deze bestudeerd met betrekking tot een mogelijk vergelijkbare rol in gingiva. Er is namelijk behoorlijk wat kennis vergaard op het gebied van huid en aangeboren immuun reacties hierin, maar er is nog niet veel bekend over de orale mucosa in dit opzicht. Dit is beschreven in **hoofdstuk 2** waar we gebruik hebben gemaakt van keratinocyten en fibroblasten, afkomstig van zowel huid als gingiva, die gekweekt werden tot een monolaag, evenals gereconstrueerde 3-dimensionale equivalenten, om de cytokine/chemokine secretie te bepalen na een activerende stimulus (b.v. een allergeen, in het geval van de equivalenten topicaal toegediend). Het gebruik van equivalenten stelde ons hierbij in staat om de (mogelijk synergistische) effecten van de interactie tussen keratinocyten en fibroblasten te kunnen bestuderen. Naast de secretie na stimulatie met $\text{TNF}\alpha$, een allergeen of een irritant, is hierbij ook de basale, homeostatische secretie bestudeerd. We vonden dat de cytokines die een belangrijke rol spelen in de LC migratie in de huid in veel lagere hoeveelheden werden uitgescheiden door keratinocyten en fibroblasten van de gingiva, zelfs nadat de cellen waren gestimuleerd met potente pro-inflammatoire cytokines zoals $\text{TNF}\alpha$ en $\text{IL-1}\alpha$. Ondanks dat LC in staat zijn om na een topicale blootstelling te migreren vanuit het epitheel naar het onderliggende bindweefsel in zowel huid als gingiva, blijken hier verschillende chemokines bij betrokken te zijn. Met deze differentiële regulatie zou rekening gehouden moeten worden bij het ontwikkelen van een nieuwe behandelingen of vaccinatie strategieën in de context van huid versus orale mucosa.

Gebruikmakend van een humaan huid equivalent model, waarin LC afkomstig van de MUTZ-3 cellijn waren geïncorporeerd in de epidermis (opperhuid), werd de migratie en plasticiteit van de LC bestudeerd na topicale blootstelling aan allergenen of irritantia. Zoals beschreven in **hoofdstuk 3**, bleken LC na topicale blootstelling anders te reageren op allergenen dan op irritantia. In het geval van blootstelling aan een allergeen, migreerde en matureerde de MUTZ-3 LC stelselmatig met een vermogen vervolgens T cellen te activeren in drainerende lymfeklieren (en zo een allergische reactie te starten). In het geval van blootstelling aan een irritant migreerden de LC ook, maar rijpten niet uit: van een LC veranderden zij in (c.q. trans-differentieerden zij naar) $\text{CD1a}^-/\text{CD14}^+/\text{CD68}^+$ macrofaag-achtige cellen. Het was mogelijk de allergeen-geïnduceerde migratie te remmen met neutraliserende antilichamen tegen het chemokine CXCL12 en de irritant-geïnduceerde migratie met antilichamen tegen het chemokine CCL5. Ook was het mogelijk de LC-naar-macrofaag transitie te voorkomen met anti-IL-10. Een belangrijke constatering is dat al deze waargenomen fenomenen volledig in overeenstemming zijn met bevindingen voor de fysiologische LC tegenhangers in explant kweken van humane huid. Zo wordt de fysiologische relevantie van dit equivalente huidmodel onderstreept en daarmee de bruikbaarheid ervan voor het testen van potentiële allergenen en irritantia.

In **hoofdstuk 4** staan de resultaten beschreven van een vergelijkende studie waarbij er is gekeken naar het fenotype en de functionaliteit van DC subsets migrerend uit explanten van de huid of gingiva. Deze cellen zijn na migratie geanalyseerd door middel van flow cytometrie en hun cytokine secretie is gemeten, alsmede hun vermogen allogene T cel responsen te induceren en naar een bepaald cytokine profiel te kunnen laten differentiëren. Dit was nog niet gedaan voor orale mucosa: we wilden daarom een betere indruk krijgen van de DC subsets in gingiva en hun vermogen T cel responsen te beïnvloeden. Met de in dit hoofdstuk verkregen data zijn we zo een stapje dichterbij gekomen om de verschillen beter te begrijpen tussen humane huid en orale DC subsets, zowel in fenotype als in functie. Op basis van fenotype hebben we de zelfde DC subsets aangetroffen (en in vergelijkbare verhoudingen) na migratie uit huid en gingiva explanten, maar verrassend genoeg was er een opmerkelijk verschil in hun vermogen T cellen te stimuleren. We zagen dat de DC die uit de gingiva explanten waren gemigreerd veel krachtiger waren in het stimuleren van T cellen en deze naar een meer pro-inflammatoir Th1 profiel deden differentiëren. Dit lijkt in tegenspraak met de algemeen heersende opvatting dat antigeen blootstelling van de orale mucosa automatisch zou leiden tot T cel tolerantie. Tevens biedt deze bevinding mogelijkheden voor het ontwikkelen van orale therapeutische vaccins, bijvoorbeeld voor kanker.

Los van het feit dat verse en gezonde huid en gingiva explanten zeer waardevol zijn om DC biologie te bestuderen, is het niet eenvoudig om ze geregeld en tijdig naar het laboratorium te krijgen voor het plannen van grootschalige screens op allergene en irritante eigenschappen van stoffen na topicale blootstelling. De weefsels verliezen hun viabiliteit en immuun cellen zeer snel (binnen 24-48 uur). Bovendien zal er sprake zijn van donor variabiliteit en zijn de beschikbare gingiva biopten zeer klein. Dit alles zorgt voor behoorlijke beperkingen wanneer men deze weefsels wil gebruiken voor onderzoek. Om deze horde te overkomen hebben we in analogie van ons eerder beschreven huid equivalent een gingiva equivalent ontwikkeld met geïncorporeerde LC (afkomstig van de MUTZ-3 cellijn) in het epitheel. Zoals beschreven in **hoofdstuk 5** hebben we met behulp van dit model kunnen constateren dat de LC migratie van het epitheel naar het onderliggende bindweefsel na topicale blootstelling aan het allergeen cinnamaldehyde onafhankelijk verliep van CXCL12. In huid equivalenten konden we deze migratie wel remmen met neutraliserende antilichamen tegen CXCL12. Deze data zijn volledig in overeenstemming met onze bevindingen uit **hoofdstukken 2 en 3** en bevestigen wederom onderliggende verschillen in de regulering van LC migratie uit huid en gingiva. Ze zijn ook in overeenstemming met de observatie (beschreven in **hoofdstuk 4**) dat LC, migrerend uit huid explanten, de CXCL12 receptor (CXCR4) tot expressie brengen op hun oppervlak –en LC, migrerend uit gingiva explanten, *niet*.

Tenslotte bediscussiëren we in **hoofdstuk 6** het belang van onze bevindingen voor het onderzoeksveld en mogelijke toepassingen in onderzoek naar huid en orale mucosa aandoeningen (zoals bijv. allergieën). Tevens worden mogelijke toekomstperspectieven voor het gebruik van deze nieuw ontwikkelde *in vitro* 3D equivalent modellen besproken, onder andere de mogelijkheid ze in te bouwen in chips met kanaaltjes die een microcirculatie mogelijk maken (“organ-on-chip” modellen). Dit zou het mogelijk maken de equivalenten langer in leven te houden en ze te bestuderen in de context van andere 3D orgaan modellen op één chip (bijv. om de migratie tussen organen van immuun of tumor cellen te bestuderen). Deze opwindende ontwikkelingen, mogelijk gemaakt door steeds geavanceerdere nanotechnologieën, zou uiteindelijk kunnen leiden tot een volledig humaan multi-orgaan model dat proefdiermodellen zou kunnen gaan vervangen.