

<http://hdl.handle.net/1765/106000>



Summaries

SUMMARY

Atopic dermatitis (AD) is a common chronic inflammatory skin disease affecting up to 25% of the children and 7% of adults. The disease pathogenesis of AD is complex and an impaired skin barrier and altered immune mechanisms are considered the two major players in AD inflammation. Also, changes in the skin microbiome are well described in AD. The microbiome is the collection of all the microorganisms living in and on the human body. Different body sites, such as the gut, nose and skin, harbor distinct microbial communities that are essential for maintaining health. For example, the skin microbiome is important for the mechanical and the immunological barrier function of the skin. It is still poorly understood how the altered microbial composition that is seen in patients with AD plays a role in the pathogenesis of the disease. Insight in the role of the microbiome in the pathogenesis of AD may help determine the added value of treatment strategies that target the microbiome in AD. It will also guide the development of new treatment strategies to modulate the microbiome.

Chapter 1 is the general introduction and provides the main objectives of this thesis. We first aimed to characterize the microbial composition of the skin, nose and gut in pediatric patients with mild to severe AD. Our second aim was to estimate the prevalence of *S. aureus* in patients with AD and to study the humoral immune response against *S. aureus*. Additionally, we aimed to design a clinical study to test the effect of a new endolysin-based therapy that specifically targets *S. aureus* in AD.

PART I of this thesis describes the microbiome in patients with AD, including associations with disease severity and food allergy. In **Chapter 2** we characterized the bacterial microbiota of the skin and nose using 16S rRNA sequencing in a cohort of children with AD. We concluded that both the skin and nasal microbiome are associated with the severity of AD. Results were independent of age, use of medication and location of sampling and suggest that both the skin and nasal microbiome influence the severity of the inflammation in AD. In both the skin and nose an increased abundance of the genus *Staphylococcus* was an important contributor to the association. However, increased or decreased abundance of other species was also found to contribute. We additionally concluded that the nose and skin harbor distinct bacterial communities, but observed that correlations exist between species in the nose and (other) species on the skin. The underlying biological mechanisms of these correlations need to be further explored. In **Chapter 3** we described a proof of concept study in which we characterized the gut microbiome in pediatric patients with AD, with and without a food allergy. We found that six bacterial species, when combined, discriminate between children with

and without food allergy. Our results need to be confirmed in larger studies using well-defined patient populations.

PART II describes the role of *S. aureus* in atopic dermatitis and the human immune response towards it. In **Chapter 4** we presented the results of a systematic review and meta-analysis and concluded that patients with AD have a higher risk of having *S. aureus* present on the skin (lesional and non-lesional) and in the nose compared to controls. This risk increases with disease severity for lesional skin. Based on the results of this study we encourage further evaluation of the role of *S. aureus* and antistaphylococcal therapy in AD. **Chapter 5** outlines a systematic review and meta-analysis that shows that IgE against staphylococcal enterotoxin (SE) A and SEB in the serum is found more often in patients with AD compared to healthy controls. Data on IgG, IgM and IgA as well as other antigens were limited. The increased IgE response against *S. aureus* superantigens in certain patients indicates that *S. aureus* might stimulate AD inflammation via IgE mediated mechanisms, such as mast-cell degranulation, in a subgroup of patients. In **Chapter 6** we profiled IgG antibodies against 55 *S. aureus* antigens in sera of two pediatric cohorts with mild to severe AD. We found that children develop an IgG mediated humoral immune response towards the different antigens, showing that the children are exposed to a wide range of antigens. In one of the cohorts, the response against a group of mainly secreted proteins with immune-modulatory functions was associated with AD severity. The exact pathophysiological mechanism that explains our findings has to be further explored. It could be that *S. aureus* uses immune-modulatory mechanisms to maintain its colonization on the skin, which can lead to persistence of AD inflammation.

PART III describes methods to study the effect of a newly developed targeted therapy directed against *S. aureus* in AD. In **Chapter 7** we compared a dry flocculated swab with a scrub to collect skin microbiome samples as a pilot for a clinical trial. We concluded that scrubs result in a higher collection of bacterial and especially fungal DNA. However, dry flocculated swabs identify the dominant sequences of the bacterial microbiota equally well as scrubs. The results suggest that scrubs are preferable when working with fungi or low- biomass skin areas. **Chapter 8** describes the study protocol of a randomized controlled trial that studies the effect of local application of a new endolysin-based therapy that specifically targets *S. aureus* on the corticosteroid use and symptoms in AD. Methodological considerations and lessons learned from the former chapters, such as the choice for a scrub sample method, are outlined in the study design.

Finally, in **Chapter 9**, we provided a general overview of the main findings, discussed the clinical implications of these findings, considered the limitations of our research and suggested directions for future research. This thesis shows the relevance of the

microbiome, in particular *S. aureus*, in the pathogenesis of AD. We proposed a model for AD pathogenesis that includes the (skin) microbiome, next to the skin barrier and immune system, as a main component involved in AD etiology. Together, the components contribute to a balanced ecosystem important for a healthy skin, influenced by genes and environment. A disturbance in one of the components can lead to a disbalance of the ecosystem and eventually chronic inflammation. We found that *S. aureus*, but also other microbes on the skin and microbial communities in the nose, might be involved in AD inflammation. *S. aureus* seems to evoke immune responses via different mechanisms, as a directly stimulating antigen and as an allergen. The results of this thesis may contribute to the development of treatment strategies that target the microbiome in AD. Further prospective cohort studies and experimental research is needed to clarify the role of the microbiome in AD and study how the microbiome may be modulated to improve AD symptoms. As the role of the microbiome likely differs between patients, it is important to define subpopulations of patients, based on epidermal, immunological and microbial biomarkers, to predict treatment response and better guide therapeutic approaches. Eventually this will lead to more personalized treatment in AD.

SAMENVATTING

Constitutioneel eczeem (CE) is de meest voorkomende chronische inflammatoire huidaandoening. Tot 25% van de kinderen en 7% van de volwassenen lijdt aan CE. De pathogenese van de aandoening is complex, maar de belangrijkste factoren die bijdragen aan de inflammatie bij CE zijn een defect van de huidbarrière en een veranderde activiteit van het immuunsysteem. Daarnaast zijn er bij CE ook veranderingen in de samenstelling van het microbioom beschreven, met name van de huid. Het microbioom is de verzameling van alle micro-organismen in en op ons lichaam. Micro-organismen bevinden zich op verschillende plekken in en op ons lichaam, waaronder de huid, de neus en de darmen. In de gezonde situatie vormen de micro-organismen een ecosysteem met hun gastheer en vervullen ze belangrijke functies, zoals bijvoorbeeld het versterken van de mechanische en immunologische barrière van de huid. Het is nog onduidelijk wat de precieze rol is van de veranderingen in het microbioom in de pathogenese van CE. Meer inzicht in de rol van het microbioom van de huid, neus en darmen bij CE helpt bepalen of therapie gericht op het microbioom van toegevoegde waarde kan zijn en is van belang voor het ontwikkelen van nieuwe gerichte behandelstrategieën op dit vlak.

Hoofdstuk 1 is een algemene introductie en beschrijft de belangrijkste doelstellingen van dit proefschrift. We stelden ons ten doel om het microbioom van de huid, neus en darmen in kaart te brengen bij kinderen met mild tot ernstig CE. Daarna bepaalden we de aanwezigheid van *S. aureus* bij patiënten met CE en de humorale immunrespons tegen *S. aureus*. Een laatste doel was het opzetten van een klinische trial om het effect van een nieuwe behandelstrategie, gebaseerd op endolysinen technologie en specifiek gericht tegen *S. aureus*, te testen bij CE.

Deel I van dit proefschrift beschrijft de samenstelling van het microbioom in patiënten met CE in relatie tot de ernst van de ziekte en het hebben van een voedselallergie. In **Hoofdstuk 2** karakteriseerden we het bacteriële microbioom van de huid en neus middels 16S rRNA sequencing in een cohort van kinderen met CE. We concludeerden hieruit dat de samenstelling van het microbioom van de huid en neus beiden geassocieerd zijn met de ernst van het CE. Deze resultaten bleken onafhankelijk te zijn van de leeftijd van het kind, het gebruik van antibiotica en de locatie waar het huidsample was afgenomen. De resultaten suggereren dat het microbioom van de huid en neus beiden een rol spelen bij de ernst van de inflammatie in CE. Een verhoogde aanwezigheid van *Staphylococci* leverde een belangrijke bijdrage aan de associatie tussen het huid- en neusmicrobiom en de ernst van het CE. Echter, verhoogde of verlaagde aanwezigheid van andere bacteriesoorten bleek ook een rol te spelen. Als laatste concludeerden we dat het microbiom van de neus en de huid beiden een unieke samenstelling hebben,

maar dat er wel correlaties bestaan tussen soorten in de neus en (andere) species op de huid. De onderliggende mechanismen voor deze correlaties dienen verder geëvalueerd te worden. In **Hoofdstuk 3** beschreven we het microbioom van de darm bij kinderen met eczeem met en zonder een voedselallergie in een pilotstudie. We vonden dat de combinatie van zes bacteriesoorten discrimineert tussen kinderen met voedselallergie en CE en kinderen zonder een voedselallergie en CE. Deze resultaten moeten verder gevalideerd worden in grotere cohort studies met goed gekarakteriseerde patiëntgroepen.

In **deel II** van dit proefschrift werd specifiek naar de rol van *S. aureus* gekeken en naar de reactie van het humane immuunsysteem op de bacterie. In **Hoofdstuk 4** presenteerden we resultaten van een systematisch literatuur onderzoek en meta-analyse waaruit we concluderen dat bij patiënten met CE vaker *S. aureus* gevonden wordt in de neus en op de huid, zowel lesionaal als niet-lesionaal. Ernstiger CE gaat samen op met een verhoogde aanwezigheid van *S. aureus* op de lesionale huid. Deze resultaten moedigen aan tot meer onderzoek naar de precieze rol van *S. aureus* bij eczeem en de toegevoegde waarde van therapie gericht tegen deze bacterie. In **Hoofdstuk 5** beschreven we een systematisch literatuur onderzoek met meta-analyse welke laat zien dat bij patiënten met CE vaker IgE tegen Staphylococcus enterotoxinen A en B wordt gevonden in het bloed dan bij gezonde controles. Studies die rapporteerden over IgE tegen andere antigenen en over IgG, IgM en IgA, waren zeer schaars. De verhoogde aanwezigheid van IgE tegen *S. aureus* antigenen in bepaalde patiënten suggereert dat *S. aureus* de inflammatie in CE stimuleert via IgE gemedieerde mechanismen, zoals mestcel degranulatie. In **Hoofdstuk 6** bepaalden we de serum IgG antilichaam respons tegen 55 *S. aureus* antigenen in twee cohorten bestaande uit kinderen met CE. We vonden een IgG gemedieerde immuunrespons tegen veel antigenen in beide cohorten wat suggereert dat kinderen met CE worden blootgesteld aan een breed scala aan *S. aureus* antigenen. In een van de cohorten vonden we dat de IgG respons tegen vooral immuun-modulerende antigenen geassocieerd was met de ernst van het CE. Verklarende mechanismen voor deze observatie zouden verder onderzocht moeten worden. Mogelijk kan de *S. aureus* bacterie door middel van het moduleren van het humane immuun systeem zijn positie op de huid behouden, wat kan leiden tot chronische inflammatie in CE.

Deel III van dit proefschrift beschrijft methoden om het effect van een nieuwe interventie gericht tegen *S. aureus* bij CE te testen. In **Hoofdstuk 7** vergeleken we een droge 'flocked' swab met een scrub voor afname van huidmateriaal voor microbioom onderzoek, als een pilot voor een klinische studie. De scrubs resulteerden in meer opbrengst van bacterieel en schimmel DNA, wat suggereert dat het gebruik van scrubs van toegevoegde waarde is, met name wanneer men geïnteresseerd is in schimmels en gisten en in gebieden van

de huid die bekend staan om hun lage microbiële biomassa. Echter, de swab methode presteerde even goed met betrekking tot het identificeren van de meest voorkomende bacteriën. **Hoofdstuk 8** beschrijft een studieprotocol voor een gerandomiseerde en gecontroleerde klinische trial waarbij gekeken wordt naar het effect van een nieuwe interventie, gebaseerd op endolysinen technologie en specifiek gericht tegen *S. aureus*, op het corticosteroïd gebruik en de symptomen bij CE. Leerpunten uit de voorgaande hoofdstukken werden meegenomen bij het ontwerpen van de trial, zoals de keuze voor de scrub sample methode.

Ten slotte werd in **Hoofdstuk 9** een overzicht gegeven van de belangrijkste bevindingen uit dit proefschrift. We benoemden de methodologische beperkingen van de beschreven studies, bediscussieerden de implicaties van de bevindingen voor de kliniek en deden aanbevelingen voor toekomstig onderzoek. In deze thesis beschreven we dat het microbioom en met name *S. aureus*, een relevante rol speelt in de pathogenese van CE. We stelden een ziekte model voor waarbij we beschreven dat het microbioom en belangrijke component vormt, naast de huid barrière en het immuun systeem. De drie componenten vormen samen een gebalanceerd ecosysteem, wat interacteert met genetische en omgevingsfactoren, en van belang is voor een gezonde huid. Een verstoring in een van de componenten kan tot een disbalans in het hele ecosysteem leiden, met chronische inflammatie tot gevolg. We vonden dat *S. aureus*, maar ook andere micro-organismen op de huid en in de neus een rol zouden kunnen spelen in de inflammatie bij CE. *S. aureus* lijkt via verschillende mechanismen met het immuun systeem te interacteren, enerzijds als antigeen en anderzijds als allergeen. De resultaten van dit proefschrift dragen mogelijk bij aan de ontwikkeling van behandelstrategieën voor CE die gericht zijn op modulatie van het microbioom. Toekomstige prospectieve studies, op cohort- en experimentele basis, zijn nodig om de rol van het microbioom bij CE beter te begrijpen en nieuwe behandelstrategieën te onderzoeken. De rol van het microbioom in de pathogenese verschilt waarschijnlijk tussen patiënten. Het identificeren van subgroepen van patiënten met CE, op basis van epidermale, immunologische en microbiële biomarkers, is belangrijk om gerichtere behandelstrategieën in te kunnen zetten. Dit zal uiteindelijk leiden tot meer gepersonaliseerde behandeling van CE.