



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Host-microbe interactions in reconstructed human gingiva in vitro

Shang, L.

Publication date

2020

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Shang, L. (2020). *Host-microbe interactions in reconstructed human gingiva in vitro*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Appendices

**Samenvatting
Summary in Dutch**

In de mond zijn altijd bacteriën aanwezig. De interacties tussen deze bacteriën en hun gastheer beïnvloeden de mondgezondheid. Net als de commensale bacteriën in de darm en de huid, maken de mondbacteriën ook deel uit van onze fysiologie en leveren mogelijk een positieve bijdrage aan de mond. Er is al veel onderzoek gedaan naar de invloed van bacteriën op de mondgezondheid. Maar dit is vooral gericht op pathogene bacteriën die betrokken zijn bij het ontstaan van mondziekten, zoals de vorming van gaatjes (cariës) en tandvleesontsteking (parodontitis). Er is nog maar weinig bekend over de positieve effecten van commensale bacteriën op de mondgezondheid. Het doel van dit proefschrift was meer inzicht te krijgen in de invloed van de commensale bacteriën in de mondholte. Daarvoor hebben we een organotypische tandvleesmodel ontwikkeld. Dit model kan gebruikt worden voor onderzoek naar de interacties tussen het tandvlees en de commensale bacteriën of de combinatie van commensale bacteriën en metaal. Het tandvleesmodel bestaat uit het bovenliggend epitheel en het onderliggende bindweefsel, met sterke fysiologische overeenkomsten in vergelijking tot menselijk tandvlees. Daarnaast zijn er representatieve multi-species orale biofilms, die vanuit menselijk speeksel werden gegroeid, gebruikt om de in vivo microbiologische omgeving te imiteren. Het tandvleesmodel werd blootgesteld aan verschillende condities om de volgende vragen te beantwoorden:

1) Hebben de commensale biofilms positieve effecten op het tandvleesmodel?

In **hoofdstuk 2** werd de invloed van de multi-species microcosm biofilm op het tandvleesmodel onderzocht. Van het tandvleesmodel was al bekend dat, het zonder blootstelling aan een biofilm, morfologisch en functioneel overeenkomen met normaal tandvlees en zijn barrièrefuncties. Het epitheel blijft zich vernieuwen doordat er proliferatie en differentiatie plaats vindt, van uit de cellen in de basale cellaag, naar het oppervlak. Wat bijdraagt aan een efficiënte opruiming van schadelijke indringers of reparatie van beschadigd weefsel. Verder vindt er in samenwerking met de fibroblasten, uit het onderliggende bindweefsel, een basale secretie plaats van functionele cytokines. Maar wat gebeurt er met het tandvleesmodel als het in contact komt met de multi-species microcosm biofilm? Dit is getest door het tandvleesmodel bloot te stellen aan een commensale biofilm voor 1/2/4/7 dagen. Na de blootstelling trede er een specifieke verandering op van de epitheel laag. Waarbij de kenmerkende barrière zich verder ontwikkelde en verbeterde. Het epitheel werd dikker, met verhoogde proliferatie en differentiatie vanuit de basale laag; de secretie van cytokines werd verhoogd, en de

transcriptie/expressie van antimicrobiële peptiden waren toegenomen. De blootstelling aan een commensale microcosm biofilm biedt dus, net als bij echt tandvlees, een betere verdediging tegen trauma en pathogene en/of toxische stoffen. Op dit moment zijn er weinig in vitro modellen die laten zien hoe de orale commensale bacteriën het tandvlees beïnvloeden. Bovendien, is de tijd van een blootstelling nooit langer dan 48 uren. Dit om besmetting te voorkomen door ongewenste begroeiing van bacteriën. Daarom is er in **hoofdstuk 2** ook gekeken naar de reactie van het tandvleesmodel op de biofilm voor een langere periode (7 dagen). Dit terwijl de antibiotica penicilline/streptomycine aanwezig was in het supernatant. De invloed van dit antibiotica op de biofilm wordt gezien als minimaal omdat de biofilm wordt aangebracht op het oppervlak van het tandvleesmodel. Ondanks dat de levensvatbaarheid van de biofilm aanzienlijk was afgenomen gedurende de 7 dagen, waren er duidelijke positieve effecten zichtbaar op de tandvleesmodellen. Echter is het voor toekomstige onderzoek, naar de dynamische host-microbe interactie tussen tandvlees en biofilm, noodzakelijk dat er een levensvatbaardere biofilm en een stabielere co-culture model wordt ontwikkeld.

2) Hebben pathogene biofilms een andere invloed op het tandvleesmodel dan commensale biofilms?

Om te bepalen op welke manier de pathogene biofilms en de commensale biofilms de tandvleesmodellen beïnvloeden, werd er in **hoofdstuk 3** gekeken naar een groep genen die betrokken zijn bij Toll-Like Receptor (TLR) signaling pathway. Dit is onderzocht door middel van blootstellingen aan drie verschillende type biofilms, representatief voor commensaal (gezond), tandvleesontsteking en carcinogeen (pathogenen). Met de commensale biofilm, kwamen veel genen van TLR signaling verhoogd tot expressie in het tandvleesmodel. Deze reactie was veel groter dan na blootstelling aan de pathogene biofilms. Dit laat zien dat de TLR signaling een belangrijke rol speelt in het tandvlees in reactie op verschillende biofilms. Mogelijk werd de TLR signaling geactiveerd, door de commensale biofilm, om een volledig verdediging in gang te zetten. Dit tegen mogelijk schade in de mond. In tegenstelling tot de pathogene biofilm die minder potentie heeft om de verdediging te activeren.

- 3) Worden de in vitro orale biofilms beïnvloed door de gastheer als in vivo? Spelen bijvoorbeeld verschillende oppervlakken in de mondholte, of de voedingsstoffen een rol?

In **hoofdstuk 4** werd de invloed van de omgeving op de biofilm onderzocht. In de mondholte zijn de host-biofilm interacties dynamisch, en de omgeving draagt veel bij aan het onderhoud en verandering van dergelijk interacties. Van twee omgevingsfactoren, de voedingsstoffen en substraten, werd onderzocht wat hun invloed was op de eigenschappen van de speeksel biofilms in de tijd (1/3/5 dagen). Dit werd gedaan door gebruik te maken van twee kweekmedia: BHI en Thompson, en drie orale substraten: tandvlees (tandvleesmodellen), tanden (hydroxyapatiet schijfjes, HAP) en tandimplantaten (titanium schijfjes, TI). In het algemeen is de samenstelling van de in vitro gegroeide biofilm binnen 5 dagen vergelijkbaar met het speeksel inoculum. Op het biotische tandvleesmodel, verschilde de invloed van de BHI en TP op de microbiële samenstelling, weinig van elkaar. Dit in tegenstelling tot de biofilm die gegroeid werd op de twee abiotische substraten, HAP en TI. Deze biofilm veranderde wel van samenstelling, afhankelijk van het gebruikte kweekmedium. Dit laat zien dat de combinatie van zowel kweekmedia als substraten invloed heeft op de in vitro biofilm. En tegelijkertijd biedt het informatie over de manier waarop de orale biofilm beïnvloed wordt door de mond.

- 4) Er zijn ook andere stoffen die in de mond af en toe aanwezig, zoals metalen van tandheelkundig materiaal. Spelen de commensale bacteriën ook een rol in de reactie van de tandvleesmodellen tegen deze metalen, bijvoorbeeld nikkel of titanium?

In de **hoofdstuk 5** werd de invloed van de commensale bacterie, *Streptococcus mitis*, op het tandvleesmodel/huidmodel onderzocht, in combinatie met een blootstelling aan nikkel of titanium. De cytokine uitscheiding was verhoogd na de blootstelling aan *S. mitis* in het huidmodel maar niet in het tandvleesmodel. Daarnaast veroorzaakte de toevoeging van nikkel, in aanwezigheid van *S. mitis*, een nog hogere cytokine uitscheiding in het huidmodel. Dit in tegenstelling tot titanium wat inert is gebleven in beide modellen. Dit laat zien dat het tandvleesmodel en het huidmodel verschillend reageren op de aanwezigheid van de commensale bacterie *S. mitis*. Ook reageren ze anders op de gelijktijdige blootstelling aan *S. mitis* met nikkel of titanium. Mogelijk spelen de commensale bacteriën zoals *S. mitis* een belangrijke rol in de huid en de mond, tijdens de blootstelling aan gangbare metalen zoals nikkel. Wat kan leiden tot een allergische reactie. Uit verder

onderzoek naar de (TLR) signaling pathway blijkt dat TLR1 en TLR4 hierbij mogelijk een belangrijke rol spelen, met elk hun eigen functie. Dit was de eerste keer dat levende commensale bacterie zijn gebruikt op een organotypische huid/tandvleesmodel. Door het duidelijke verschil tussen nikkel en titanium blijkt hoe belangrijk het gebruik van de levende commensale bacteriën kan zijn.

Appendices

**Author contributions
and acknowledgements**

Chapter 2: Multi-species oral biofilm promotes reconstructed human gingiva epithelial barrier function.

Lin Shang, Dongmei Deng, Jeroen K. Buskermolen, Marleen M. Janus, Bastiaan P. Krom, Sanne Roffel, Taco Waaijman, Cor van Loveren, Wim Crielaard, Susan Gibbs

Conceived and designed the study: LS, DD, SG

Performed the study: LS, JB, MJ, SR, TW

Analyzed the data: LS, SG

Drafted the manuscript: LS

Critically revised the manuscript: DD, BK, CL, WC, SG

Acknowledgements: The authors thank Sander W. Spiekstra for his technical support and the financial support provided by the Chinese Scholarship Council.

Chapter 3: Commensal and pathogenic biofilms alter toll-like receptor signaling in reconstructed human gingiva.

Lin Shang, Dongmei Deng, Jeroen K. Buskermolen, Sanne Roffel, Marleen M. Janus, Bastiaan P. Krom, Wim Crielaard, Susan Gibbs

Conceived and designed the study: LS, SG

Performed the study: LS, JB, SR, MJ

Analyzed the data: LS, SR

Drafted the manuscript: LS

Critically revised the manuscript: DD, BK, WC, SG

Acknowledgements: The authors thank Maria Thon for her technical support and Bernd W. Brandt for his suggestions on the data analysis. We thank the Chinese Scholarship Council for their financial support.

Chapter 4: Saliva-derived microcosm biofilms grown on different oral surfaces in vitro.

Xiao Lan Li, Lin Shang, Bernd W. Brandt, Mark J. Buijs, Sanne Roffel, Cor van Loveren, Wim Crielaard, Susan Gibbs, Dongmei Deng

Conceived and designed the study: XL, LS, DD, SG

Performed the study: XL, LS, MB, SR

Analyzed the data: XL, LS, BB, DD

Drafted the manuscript: XL, LS, DD

Critically revised the manuscript: LS, BB, CL, WC, SG, DD

Appendices

Acknowledgements: The authors thank the Chinese Scholarship Council for their financial support.

Chapter 5: Differential influence of *Streptococcus mitis* on host response to metals in reconstructed human skin and oral mucosa.

Lin Shang, Dongmei Deng, Sanne Roffel, Susan Gibbs

Conceived and designed the study: LS, DD, SG

Performed the study: LS, SR

Analyzed the data: LS

Drafted the manuscript: LS

Critically revised the manuscript: DD, SG

Acknowledgements: The authors thank Sander W Spiekstra for technical assistance and the China Scholarship Council for financial support.

Appendices

Dankwoord

First of all I'd like to thank my supervisors prof. Susan Gibbs, prof. Wim Crielaard, dr. Dongmei Deng and prof. Cor van Loveren. Thank you all for your kind help and support during my PhD study.

Sue, you have been such a nice guide to me, I can never thank you enough for all the help, support and encouragement you gave me. No matter for research or for daily life, you are always kind, patient, you see (maybe even better than) the best in me and bring it out. Your enthusiasm for research is contagious, which inspired me so much and helped me to get through difficult time. I really appreciate it and enjoyed my PhD study under your supervision, thank you!

Dongmei, there was more than one time you suggested that I should and I could be more "independent" in research. Thank you for believing in me. But whenever I see you around, I would feel "safer" since you have helped me so much, from the very beginning when I had to adapt to this new environment, to teaching me how to do research in a precise and logical way. Thank you for your support on all the little and big things.

Wim, I am grateful for having you as a supervisor. Every time when I came to you for help, you gave me a hand with useful advices. As I see it, you are open and friendly to others (and have a great sense of humor!) meanwhile holding on to your own principles, which makes your suggestions even more convincing to me.

Cor, thank you for bringing me this great opportunity to start studying in this country far away from my homeland. Without you, I could never have experienced so many wonderful things with all those lovely people I met here!

Dear members of the committee: prof. dr. Egija Zaura, prof. dr. Fred. R. Rozema, prof. dr. Joost Teixeira de Mattos, prof. dr. Cees J. Kleverlaan, prof. dr. Tanja de Gruijl, dr. Ellen van den Bogaard, dr. Bastiaan P. Krom, thank you all for being willing to evaluate this thesis. I sincerely appreciate it.

I want to especially thank all of my friends, you would never know how grateful I am to have you in my life. **Sanne**, my first and best Dutch/Frisian friend, thank you for being there for me no matter what happens. You have been inspiring me to be a better person, supporting every decision I made and you are always willing to help me along the way. It took me a while to discover how incredibly nice it is to be friends with you, and I am really glad that I met you and got to know you. **Pilar**, my best adventure amigo for traveling and for life! You have the magic to make everything fun and cool. I am always looking forward to hearing stories from you

which are usually more stunning than a movie!! I had so much fun with you and will always be your number one fans. Wish I will continue showing up now and then in your life in the future (hihi). **Yaling**, even though we have only known each other for not long, you became the closest thing to a sister I ever had. It feels just right to share every good and bad moments with you. Here is a friendly warning to you (and also to **Bing**): get prepared to be annoyed by me for the rest of your life! **Elisabetta**, the sweetest person I have ever known, with endless kindness and brightness inside you which make the world a nicer place for everyone. You have the gift to make people feel comfortable around you, including me of course, so that we are willing to show our true self in front of you. During the lockdown I really missed our go-get-coffee marching, and the time when we could just easily expand a short question to a long talk (oops). **Judith**, my gratitude to you is beyond words but I bet you understand that! You brought warmth and joy to every memory we share, and you would always give me positive response even when I am being extremely annoying :p. I want to thank you especially for your encouragement – on everything that I'd like to try, for example to learn Dutch – heel erg bedankt dat je altijd zo geduldig met me bent. **Yan**, I was amazed at how soon we click with each other, and I really cannot explain why you saying serious things would sound so hilarious to me! Please keep it, and please try to remember your PWs XD. **Wenjun**, the pure goodness in you makes everyone around you feel relaxed and comfortable. Sometimes it is really difficult to stop laughing when I recall your legendary episodes, so please keep me updated!! I wish you lots of happiness in your new journey of life with your husband and your son, and please do remember that I am always here for you whenever you need me. **Jina**, you could always cheer me up with your creativity and optimism! Thank you for all those precious memories since we met. **Athina**, thank you for your company, encouragement, and your warm hugs! It is reassuring to hear you say “it’s ok” when I am stuck with something difficult, which gives me the faith that there should be a solution (or even more than one!) to every problem. **Mengchen**, can you believe that we have already been friends for 14 years!! Our friendship is mainly built on all the stupid things we have done together :p, but it hasn't faded at all over time or distance. I am ready to continue it for the next 14 years, how about you ;)). **Fang** and **Zheng**, our late night conversations remind me from time to time about how rare our friendship is. We share similar views on lots of things, if not, we still show the most respect to each other. I am lucky to have you both in my life! **David**, you have no idea how grateful I am for all of our talks in person or by email, and how inspiring they are to me. It

really means a lot, thank you. **Xander**, my cat buddy! The first person I would think of whenever I see a funny cat photo, hope you will get more time to chill with snuggles, being next to him is the best you can give him and all he wants, right ;). **Kahena**, I hope it's not only me that feel we share many views in common, thank you for cheering me up with your warm and comforting smile! **Dini**, ik ben je enorm dankbaar voor de hulp en gezelligheid, hartelijk dank voor alles die je heeft gedaan voor mij.

Dear my Skinlab-MCBI friends, thank you for making the lab such a cozy and fun place to me! **Sander**, being in the lab with you around is always fun, sometimes I really need to remind myself to get focused on the experiment! **Maria**, you are the BEST German teacher who can teach people Dutch (and of course things in the lab)!! Je helpt me om de draad weer op te pakken, bedankt voor jouw aanmoediging en geduld. Ik krijg altijd gemakkelijke, begrijpelijke en leuke uitleg van jou! **Jeroen**, thank you so much for bearing with me and helping me since the very beginning when I just started here and literally couldn't find my way to anywhere. **Charlotte**, I am impressed that you always know what you want and you work hard for it, at the same time you care for others around you in your own friendly and quiet way. Best wishes for your new life xxx! **Taco**, a man with a good sense of humor and amazing hairstyle! Thank you for always being nice, patient and helpful. **Hanneke**, I enjoyed talking to you very much, you always have a nice answer to my questions, no matter if it's about research or just about how people live their lives here. **Maaïke**, my no-dancing ally, I have this image of you in my mind like a buried treasure – the deeper people dig the more surprises they will find in you! **Ibrahim**, **Siamaque**, **Christianne**, **Shakun**, **Lenie**, **Michiel**, **Huib**, **Alex**, **Marco**, **Nanne**, **Bert**, **Niels**, **Irit**, **Vinod**, **Renushka**, **Allyson**, **Lilian**, **Eleonora**, **Leander**, **Joey**, **Joline**, **Jasper**, **Britt**, **Jonas**, **Andrew**, thanks for all of your help and the time we share in and out the lab!

Dear members of the Preventive Dentistry ACTA, it has been a huge pleasure to work with you – such a group of people with the most knowledge and help I could possibly get. **Wendy**, I enjoyed our talks now and then. When I have doubts, you always have answers or point me in the right direction, thank you for all the encouragement en jouw aardige hulp met mijn Engels EN Nederlands! **Bastiaan**, many thanks for offering me such a great chance to work with you, I learned a lot from your positive way of thinking, and how you connect dots to a net to gain a

bigger picture in on scientific puzzles. **Mark**, always fun to talk with you, please keep me updated about all the new movies and digital goods! **Caroline, Elly, Michel** and **Rob**, thank you all for the kind help in and out the lab. **Hans, Alexa** and **Marije**, It was really cozy sharing office with you, you are really sweet just as the name of Hans :) **Catherine**, we are still having the who-leaves-on-time competition, right? I will work hard on it! **Ilona**, your chocolate pudding was even better than the one we had in the restraint in Liverpool! **Bernd**, many thanks for your kind help and answers to all of my questions from the academic field of statistics, bioinformatics and biology, to the most basics about the Dutch culture. **Egija**, thank you for sharing your experience, such as how it was for you to be a PhD student in a foreign country, which resonated with me and encouraged me a lot. Many thanks to the fellow PhD students for every moment we share together: **Yixuan, Fereshteh, Marwa, Hongyan, Fei, Ying, Yanling, Naichuan, Lingfei, Yang, Xiangyang, Andrea, Clément, Minnie, Jingmei, Kang, Danuta, Anna, Dono, Vincent, Charifa, Lilian, Wei (Zeng), Wei (Cao)** and many others.

To the colleagues in Oral cell biology ACTA, dear **Cor, Behrouz, Ineke, Jolanda, Ton, Marion, Gang, Ivana, Carolyn** and **Tijmen**, thank you all so much for your kind help in and out the 11th lab.

妈，爸，从小到大，不管我做什么选择，你们都无条件地相信我，支持我，在我遇到困难的时候鼓励我，让我做自己喜欢的事，想过自己想要的生活，用自己的方式努力成为一个更好的人。有你们做父母是我最大的幸运。也希望我可以有一天，有能力回报给你们同样的支持。谢谢你们。

