



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Development of the human fetal immune system: novel insights from high-dimensional single-cell technologies

Li, N.

Citation

Li, N. (2019, October 8). *Development of the human fetal immune system: novel insights from high-dimensional single-cell technologies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/78475>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/78475>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:
<http://hdl.handle.net/1887/78475>

Author: Li, N.

Title: Development of the human fetal immune system: novel insights from high-dimensional single-cell technologies

Issue Date: 2019-10-08

Nederlandse samenvatting

Het foetale afweersysteem

Het afweersysteem beschermt ons tegen pathogenen zoals bacteriën, virussen en schimmels. De cellulaire component van het afweersysteem bevat twee compartimenten, het innate en het adaptieve compartiment. Het innate afweersysteem bevat diverse fagocyterende cellen, antigeen presenterende cellen en lymphocyten die zorgen voor een snelle en specifieke reactie tegen binnendringende pathogenen. Tegelijkertijd reageert ook het adaptieve afweersysteem dat een veel specifiekere reactie opbouwt waarbij het gebruik maakt van antigeen-specifieke receptoren op B- en T-lymphocyten. Deze gecombineerde reactie zal uiteindelijk tot onderdrukking of eliminatie van het pathogeen leiden waarbij tegelijk geheugen wordt opgebouwd zodat hetzelfde pathogeen bij een volgende infectie sneller onschadelijk kan worden gemaakt.

Het foetale afweersysteem ontwikkelt zich tijdens de zwangerschap waarin het tolerant moet zijn tegen de deels allogene omgeving waarin de foetus zich ontwikkelt terwijl het ook moet worden voorbereid op de ontwikkeling van de bacteriële microbiota in de darm direct na de geboorte. Het afweersysteem in de darm is het grootste in ons lichaam en is continue blootgesteld aan zowel onschuldige voedselcomponenten als potentieel schadelijke bacteriën die dit afweersysteem van elkaar moet kunnen onderscheiden. Hoewel enkele studies al hebben aangetoond dat het foetale afweersysteem diverse componenten bevat, is vanwege de beperkte beschikbaarheid van foetaal weefsel de meeste kennis over het foetale afweersysteem gebaseerd op studies met navelstrengbloed. Een gedegen en brede studie naar de compositie van het foetale afweersysteem, met name in de darm, ontbrak tot op heden. In het huidige proefschrift heb ik dit onderzocht waarbij ik gebruik gemaakt heb van de nieuwste ontwikkelingen op het gebied van cellulaire analyse, waaronder massa cytometrie en RNA-sequentie bepalingen.

Massa cytometrie

Massa cytometrie is een nieuwe methode waar flow cytometrie is gekoppeld aan massa spectrometrie. In massa cytometrie worden metalen als reporters gebruikt waardoor de beperkingen van het traditionele gebruik van fluorochromen opgeheven wordt en tot 42 markers gelijktijdig geanalyseerd kunnen worden. Door deze revolutionaire innovatie kan de diversiteit en compositie van het afweersysteem tot in detail worden bestudeerd.



Het is ook mogelijk om deze techniek op weefselcoupes toe te passen, imaging massa cytometrie genaamd, waarmee het mogelijk is om de diversiteit en organisatie van het afweersysteem in de context van het weefsel te bestuderen.

Bepalen van genexpressie op cel niveau

Complementair aan massa cytometrie kan de expressie van genen van tienduizenden cellen op single-cel niveau worden bepaald waarmee de heterogeniteit van cellen en de ontdekking van zeldzame celtypes mogelijk wordt. Ook kan deze aanpak leiden tot de identificatie van cel ontwikkelingstrajecten en regulatoire netwerken binnen het afweersysteem.

Heterogeniteit en differentiatie van innate lymphocyten

In **hoofdstuk 2** is de heterogeniteit en ontwikkeling van het innate lymphoïde cel compartiment in de foetale darm bestudeerd m.b.v. massa cytometrie. Hierbij werden 34 fenotypisch verschillende innate cel clusters gevonden, waaronder reeds eerder geïdentificeerde cel clusters zoals NK cellen en CD127⁺ ILC subsets, maar ook een aantal niet eerder beschreven cel clusters. Gebruikmakend van de eigenschappen van de computationele analyse methoden konden mogelijke ontwikkelingstrajecten binnen het innate lymphoïde compartiment worden geïdentificeerd die erop duiden dat de NK cellen en ILC3 kunnen ontstaan uit Lin⁻CD7⁺CD127⁻CD45RO⁺CD56⁺ (int-ILCs) cellen. In functionele assays werd deze hypothese verder onderbouwd.

De opbouw van geheugen in de foetale darm

in **hoofdstuk 3** Is massa cytometrie gecombineerd met single-cel RNA-sequenzen, T cel receptor sequenzen, imaging massa cytometrie en flow cytometrie om het CD4 positieve T cel compartiment in de humane foetale darm te ontrafelen. Met massa cytometrie konden 22 CD4 T cel subsets worden onderscheiden waaronder naïeve, geheugen en regulatoire subsets. Middels RNA-sequenzen werd dit verder onderbouwd. Opmerkelijk genoeg produceerden de geheugen cellen ontstekings mediators zoals TNF-alpha en Interferon- γ . Ook legde een gedetailleerde en geïntegreerde analyse van de data een differentiatie traject bloot dat de vorming van geheugen ondersteunde. Tenslotte wezen zowel de co-localisatie van de geheugen T cellen met antigeen presenterende cellen in het darmweefsel zelf, en aanwijzingen voor klonale cel expansie in de darm erop dat de geheugenvorming in de foetale darm het gevolg was van blootstelling van de foetus aan omgevingsfactoren in de baarmoeder.

Weefsel-specifieke samenstelling van het afweersysteem

Om verder inzicht in het foetale afweersysteem te verkrijgen wordt in **hoofdstuk 4** beschreven hoe massa cytometrie is gebruikt om het innate and adaptieve afweersysteem in de foetale darm, milt en lever met elkaar te vergelijken. Deze analyse leidde tot de identificatie van 117 fenotypisch verschillende cel clusters waaronder zowel eerder beschreven alsmede nieuw ontdekte clusters. PCA analyse liet zien dat er grote verschillen zijn in de samenstelling van het afweersysteem in de drie geanalyseerde organen. Met imaging massa cytometrie werd deze weefsel-specifieke samenstelling bevestigd. Deze resultaten laten zien dat heel vroeg in het leven weefsel-specifieke compartimentalisatie van het afweersysteem ontstaat.

In **hoofdstuk 5** is massa cytometrie gebruikt om het afweersysteem te analyseren in darmbiopten van patiënten die leiden aan chronische darmontsteking en dat te vergelijken met dat in gezonde controles. Deze analyse liet zien dat zowel weefsel- als ziekte-specifieke immuun subsets konden worden gedetecteerd.

Conclusies

Het in dit proefschrift beschreven werk geeft een breed en gedetailleerd inzicht in de samenstelling van het foetale afweersysteem gedurende de zwangerschap. Hiervoor is gebruik gemaakt van een serie geavanceerde multiparameter technieken om cellen op single-cel niveau te bestuderen. Daarnaast is de functie van een aantal nieuw geïdentificeerde cel subsets bepaald. Hierbij is een nieuwe ILC subset gevonden die *in vitro* kan differentiëren tot zowel NK cellen als ILC3's. Hiermee is nieuw inzicht verkregen in de plasticiteit van het ILC compartiment. Verder werd gevonden dat gedurende de zwangerschap geheugen cellen worden gevormd in de foetale darm, wat er op wijst dat de foetus in de baarmoeder is blootgesteld aan omgevingsfactoren. Tenslotte is gevonden dat reeds heel vroeg in het leven het afweersysteem in verschillende weefsels een eigen signatuur heeft en het afweersysteem zich dus aanpast aan het weefsel waarin het moet functioneren. Om de functie van het afweersysteem goed te doorgronden is het dus noodzakelijk om het afweersysteem in de weefselcontext te bestuderen. Al met al biedt dit werk nieuw inzicht in de samenstelling en functie van het foetale afweersysteem, kennis die mogelijk gebruikt kan gaan worden om de ontwikkeling van ziekten die door ontregelde reacties van het afweersysteem worden veroorzaakt te voorkomen.

