



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Imaging the (un)imaginable of the Barrier Immune system

Guo, N.

### Citation

Guo, N. (2023, April 18). *Imaging the (un)imaginable of the Barrier Immune system*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3594146>

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/1887/3594146>

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

## Nederlandse Samenvatting

### Imaging mass cytometry

“Imaging mass cytometry” (IMC) is een uitbreiding op de CyTOF technologie, gekoppeld met een laser ablatie systeem, die gebruikt kan worden voor gevroren en gefixeerde weefselcoupes. Net zoals bij “single cell mass cytometry” wordt er gebruik gemaakt van metaal gelabelde antilichamen, waardoor er met een hoog aantal antilichamen gelijktijdig gekleurd kan worden.

In **hoofdstuk 2** werd het IMC kleuringsprotocol, voor het visualiseren van de weefselarchitectuur en het lokaliseren van stromale en immuun cellen in gevroren weefsel van foetale en volwassen darmsamples ontwikkeld. In **hoofdstuk 3** werd het Cytosplore Imaging-platform opgebouwd om immuun infiltraties te visualiseren die met de IMC-technologie werden gevisualiseerd. Dit maakte het mogelijk om lymfoïde structuren, samengesteld uit B-cellen, T-cellen, CD3-CD7<sup>+</sup> ILC's en myeloïde cellen, te identificeren die zich net onder het epitheel van de foetale darm bevonden. Tevens werd frequent co-expressie van CD69 en CD161 in de lymfoïde structuren gevonden.

In **hoofdstuk 4** werd een IMC-dataset van huidbiopten van gezonde controles en patiënten met mycosis fungoides verkregen en geanalyseerd om een globaal overzicht te verkrijgen van de distributie van de kwaadaardige T-cellen en de heterogeniteit van het immuunsysteem in deze patiënten en controles. We hebben verschillende clusters van CD4<sup>+</sup> T-cellen en meerdere soorten dendritische cellen kunnen waarnemen door differentiële expressie van CD11c, CD1a en CD1c in de dermis van de MF-huid.

In **hoofdstuk 5** werd IMC gebruikt om de samenstelling van het immuun compartiment in aangedane en niet-aangedane huid van psoriasispatiënten met elkaar te vergelijken. Cytosplore Imaging analyse werd gebruikt voor kwantificering van het aantal pixels per immuun cel populatie en dit toonde een significante toename van CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen, macrofagen en mestcellen in de aangedane huid, terwijl er geen significant verschil werd waargenomen voor de dendritische cel populaties. De analyse onthulde ook de aanwezigheid van zogenaamde “double feature pixels” die op pixelniveau kenmerken van zowel T-cellen markers en myeloïde cel markers herbergen, en als zodanig hoogstwaarschijnlijk nauwe interacties tussen deze cel populaties vertegenwoordigen.



### **Ontwikkeling van het menselijke foetale intestinale immuun systeem**

In **hoofdstuk 3** werd een combinatie van spectrale flowcytometrie, IMC en RNAscope gebruikt om een gedetailleerd inzicht te krijgen in de samenstelling en ruimtelijke organisatie van de ontwikkeling van het foetale intestinale immuunsysteem gedurende het tweede trimester van de zwangerschap.

Met de spectrale flowcytometrie analyse konden alle belangrijke immuun celpopulaties, en de heterogeniteit daarin geïdentificeerd worden. Bovendien visualiseerde dit clusters van Ki-67<sup>+</sup> cellen binnen alle geïdentificeerde immuun cel populaties, die tijdens het tweede trimester aanwezig bleven, wat duidt op lokale proliferatie van alle immuunpopulaties in de zich ontwikkelende darm.

IMC liet vanaf week 16 de vorming van lymfoïde structuren zien, net onder het epitheel, met daarin B-cellen, T-cellen, CD3<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup> ILC's en myeloïde cellen, en bevestigde de aanwezigheid van Ki-67<sup>+</sup> cellen in de verschillende immuunpopulaties *in situ*. Hier werd ook de aanwezigheid van CD1c<sup>+</sup> B-cellen en RORγt<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> LTi-achtige cellen, compatibel met de vorming van lymfoïde structuren, geïdentificeerd. Bovendien leverde de aanwezigheid van CXCL13-mRNA-transcripten *in situ* verder bewijs voor de vorming van follikels in de menselijke foetale darm.

Ten slotte werd een CD69<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> fenotype waargenomen die gedeeld werd door populaties van foetale intestinale CD3<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup> ILC's en T-cellen. Deze cellen werden met name in de lymfoïde structuren waargenomen en hebben co-expressie met Ki-67<sup>+</sup>-cellen, wat wijst op een rol in de ontwikkeling van deze structuren. *In vitro* waren de Ki-67<sup>+</sup>-cellen in staat tot spontane proliferatie en dit werd versterkt door IL-7-stimulatie. Samen met de aanwezigheid van IL-7 mRNA-transcripten in zowel de lamina propria als het epitheel van de menselijke foetale darm, ondersteunt dit de hypothese dat IL-7 een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van het menselijke foetale intestinale immuunsysteem.

Deze waarnemingen wijzen op de aanwezigheid van geëncymiteerde immuuncellen die in staat zijn tot lokale proliferatie, wat bijdraagt aan de ontwikkeling en groei van georganiseerde immuunstructuren gedurende het 2e trimester in de menselijke foetale darm. Vermoedelijk bereidt dit de foetus voor op de microbiële kolonisatie direct na de geboorte.

## Het immuun systeem bij huidziekten

### Mycosis Fungoides

In **hoofdstuk 4** wilden wij een beter beeld krijgen van de immuun-micro-omgeving in een vroeg stadium van mycosis fungoides (MF). Met behulp van massa cytometrie werd de samenstelling van het immuunsysteem bij individuele patiënten gekarakteriseerd. We observeerden CD4<sup>+</sup> T-cellen myeloïde celpopulaties die bij alle patiënten aanwezig waren maar tevens celpopulaties die slecht in sommige patiënten aantoonbaar waren. IMC visualiseerde aggregaten van T-cellen met verschillende soorten dendritische cellen in de dermis, waarschijnlijk betrokken bij de pathogenese van de ziekte en een potentieel doelwit voor behandeling. Deze resultaten kunnen nuttig zijn voor een betere diagnose en gepersonaliseerde behandeling van patiënten met mycosis fungoides.

### Psoriasis

In **hoofdstuk 5** hebben we IMC toegepast om immuun infiltratie te onderzoeken bij patiënten met milde tot matige psoriasis. De Cytosplore Imaging pixel analyse van de IMC-dataset identificeerde een verschillende samenstelling en organisatie in het immuun compartiment van de aangedane huidbiopten in vergelijking met de niet-aangedane huidbiopten. Daarnaast hebben we verschillende clusters van "double feature pixels" geïdentificeerd, wat indicatief is voor een interacties tussen T-cellen en verschillende populaties van myeloïde/DC-cellen, en waarschijnlijk gekoppeld aan de pathogenese. Ten slotte werd er preliminair bewijs gevonden dat de kwantiteit van deze "double feature pixels" kan correleren met de ernst van de ziekte. Dit moet in een vervolgstudie nader worden onderzocht.

Al met al toont het werk beschreven in dit proefschrift aan dat de nieuwe hoog-dimensionale technologieën een ongekend inzicht verschaffen in de samenstelling en ruimtelijke organisatie van het immuunsysteem bij gezondheid en ziekte.

