



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Multi-faceted dissection of innate myeloid cell heterogeneity: a translational approach for application in patient care

Pan, K. van der

Citation

Pan, K. van der. (2025, October 29). *Multi-faceted dissection of innate myeloid cell heterogeneity: a translational approach for application in patient care*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4281912>

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/1887/4281912>

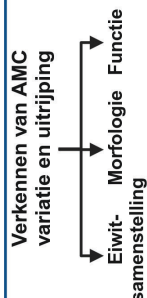
Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Meervoudig onderzoek van aangeboren myeloïde cellen en hun variatie: een translationele benadering voor toepassing in patiëntenzorg

Uitbreiding van de kennis over aangeboren myeloïde cel (AMC) biologie en de relaties tussen cel populaties



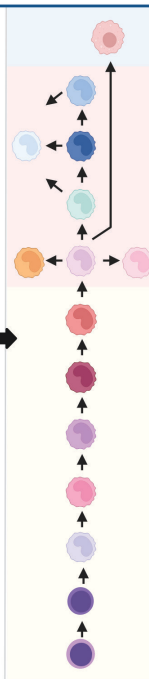
Ontwikkeling en validatie van gestandaardiseerde methodes voor immuunmonitoring



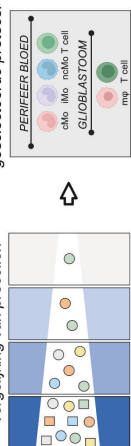
**Het landschap van de menselijke uitrijping van monocyten:
een maturatie-atlas**

Flow & massa cytometrie
(met onpartijdig panel ontwerp)

- Immuunfenotype & uitrijpingstraject gebaseerd op single-cell data
- Volledige eiwitsamenstelling
- Verschillend tot expressie gebrachte eiwitten
- Functionele relaties
 - Functionele analyse van eiwitten
 - In vitro functionele karakterisering



Selectie van het beste protocol voor eiwitstudies (MS) op monsters met kleine aantallen AMC

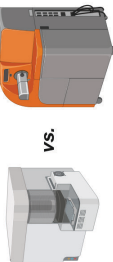


Ontwikkeling van gestandaardiseerde flow cytometrie combinatie

- Identificatie van tot 23 AMC populaties
- Zeer reproduceerbare resultaten
- Leefijd- en geslachts-gerelateerde referentiewaarden
- Geautomatiseerde database voor analyse

Vergelijking van spectrale flow cytometrie en massa cytometrie

- 21 gedeelde markers voor identificatie van AMC populaties
- Reproduceerbare resultaten voor:
 - Populatie identificatie & correlatie
 - Marker resolutie



HOOFDBOODSCHAPPEN:

- 1). Grondige ontwikkeling en validatie van methodes zijn cruciaal voor reproduceerbare resultaten en het vertalen van onderzoeksresultaten naar klinische praktijk.
- 2). Veelzijdige en gestandaardiseerde benaderingen zijn cruciaal voor het begrijpen van AMC biologie en -dynamiek bij homeostatische verstoring.

Het menselijk afweersysteem is een complex netwerk van veel verschillende afweercellen (vele verschillende myeloïde en lymfatische cellen) en diverse afweerorganen (lymfeklieren, amandelen, milt, zwezerik, beenmerg, etc.). Zij werken samen om het lichaam te beschermen tegen indringers (pathogenen zoals bacteriën en virussen) en weefselschade. Een belangrijk onderdeel is het aangeboren (= van nature aanwezige) afweersysteem, dat het lichaam beschermt tegen indringers (bv. via de huid, luchtwegen en darmen) en een snelle reactie op gang brengt als indringers toch binnenkomen (reactie binnen 1 à 2 uur). De meeste afweercellen van het aangeboren afweersysteem hebben een voorlopercel van myeloïde afkomst, maar niet allemaal. Uitzonderingen zijn 'aangeboren lymfatische cellen' (ALC), waaronder "natural killer" (NK) cellen, die weliswaar deel uitmaken van het aangeboren afweersysteem, maar een lymfatische voorlopercel hebben. ALC waren niet de focus van dit proefschrift, en daarom wordt in dit proefschrift steeds gerefereerd naar "Aangeboren Myeloïde Cellen" (AMC).

In **Hoofdstuk 1** worden alle onderdelen van het afweersysteem en hun bijbehorende functies geïntroduceerd, met speciale aandacht voor AMC. Er zijn veel verschillende varianten van AMC, om overal in het lichaam, in de verschillende organen, te kunnen snuffelen naar indringers. Daarnaast hebben AMC nog een andere belangrijke rol: ze zijn de schoonmakers en vuilnismannen van het lichaam. Zoals in iedere woonplaats, is er ook in het lichaam voortdurend sprake van opbouw en afbraak (van bv. eiwitten, cellen, weefsels), met afval als gevolg. Dit wordt opgeruimd door AMC, die altijd rondsnoeffen en dus ook afval en (bijna) dode cellen opsporen en opruimen. Door deze functies vormen AMC een waardevolle bron voor informatie over de status van het lichaam.

Hoofdstuk 1 vermeldt ook de afwijkingen van AMC-populaties zoals geobserveerd in verschillende ziektemodellen. Dit benadrukt de waarde van onderzoek naar AMC als een manier om de status van het lichaam te monitoren ('immuunmonitoring'). Helaas wordt de waarde van AMC als hulpmiddel voor immuunmonitoring nog ernstig beperkt door de onduidelijkheid over de onderlinge relaties tussen de vele verschillende AMC-populaties. Deze onduidelijkheid heeft diverse oorzaken, zoals de lage frequentie van AMC in het bloed en de beperkte toegang tot weefselmateriaal. Daarnaast leidt de variabele/ wisselende aard van AMC en het gebrek aan AMC-specifieke eiwitten tot verwarring bij identificatie van AMC, wat verder bijdraagt aan de onduidelijkheden. Om deze hindernissen weg te nemen, is in dit proefschrift gebruik gemaakt van een

veelzijdige benadering, zoals *high-throughput* cytometrische methoden en massa spectrometrie (MS), om respectievelijk de fenotypes en de volledige eiwitsamenstelling van elk type AMC in kaart te brengen.

MS is een techniek waarbij essentiële informatie over de volledige eiwitsamenstelling van een cel kan worden verkregen. Dergelijke informatie is waardevol om inzicht te krijgen in de relaties tussen de verschillende cellen, maar het gebruik van MS werd tot dusver slechts beperkt ingezet voor translationeel onderzoek (= onderzoek dat de schakel vormt tussen fundamenteel en klinisch onderzoek). De belangrijkste reden hiervoor is dat grote hoeveelheden celmateriaal nodig zijn voor de MS-gebaseerde eiwitstudies. In veel klinische situaties is het niet haalbaar om het benodigde cel- of weefselmateriaal van patiënten voor MS-onderzoek te verkrijgen. Dit probleem is nog groter bij onderzoek naar AMC-populaties, die relatief weinig voorkomen. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 2** verschillende laboratoriumprotocollen onderzocht om MS-gebaseerde eiwitstudies uit te voeren, met speciale aandacht voor hun geschiktheid voor eiwitstudies met zeer kleine celaantallen.

In **Hoofdstuk 3** zijn verschillende technieken vergeleken voor het in kaart brengen van de specifieke eiwitpatronen van kleine aantallen nauwverwante cellen. Onze stapsgewijze aanpak resulteerde in de combinatie van een ureum-gebaseerde lysisbuffer en een nieuwe verwerkingsmethode ('single pot solid-phase-enhanced sample preparation'; SP3) als het best-werkende protocol voor MS-gebaseerde eiwitstudies van kleine hoeveelheden van AMC-monsters. Reproduceerbaarheid, toegankelijkheid, de (sub)cellulaire locatie van de verkregen eiwitten, gebruiksgemak, verwerkingstijd en kosten werden meegenomen als parameters bij de selectie van onze procedure.

Na de selectie van de meest geschikte MS-gebaseerde procedure, werd deze vervolgens geïmplementeerd in **Hoofdstuk 4**, om, samen met cytometrische methoden, de relaties te bestuderen tussen AMC-populaties verkregen uit diverse menselijke weefsels: beenmerg (BM), perifeer bloed (PB), peritoneale dialysevloeistof (PD), dikke darm (colon) en huid. Niet alleen de eiwitsamenstelling van elk type cel werd hierbij bestudeerd, maar ook de functionele eigenschappen van die eiwitten en celpopulaties en de immunofenotypen, zoals onderzocht met flowcytometrie en massacytometrie.

De verschillende nieuw-geïdentificeerde en gekarakteriseerde AMC-populaties uit Hoofdstuk 4 vormen een nieuwe bron van kennis voor monitoring van ons afweersysteem. Om dat proces te vereenvoudigen,

hebben we een nieuwe, gestandaardiseerde combinatie van markers ontwikkeld voor reproduceerbare identificatie van nu bekende AMC subpopulaties door middel van flowcytometrie. Het ontwerp en de validatie van deze combinatie zijn beschreven in **Hoofdstuk 5**. Om breed gebruik mogelijk te maken, hebben we zelfs twee mogelijkheden ontwikkeld: een 11-kleurencombinatie voor gebruik in diagnostiek-gecertificeerde flowcytometers, en een 14-kleurencombinatie voor onderzoeksdoeleinden, die in staat is om extra (weinig voorkomende), AMC-celpopulaties te identificeren. De 11-kleurencombinatie is rigoureus gevalideerd voor breed gebruik op celmonsters in diverse situaties: verschillende antistollingsmiddelen (EDTA, heparine), opslagcondities (vertraagde opslag op kamertemperatuur, ingevroren opslag) en meting (conventionele en spectrale flow cytometers), en resulteerde in lage intra- en inter-assay variatie. Reproduceerbare analyse van combinaties van 11-14 kleuren kan tijdrovend zijn en vereist diepgaande kennis, al helemaal als de bestudeerde cellen vergelijkbare markers tot expressie brengen. Dit kan leiden tot variatie in de resultaten van verschillende onderzoekscentra. Vergelijking van verschillende methoden voor handmatige analyse resulteerde in een goede correlatie. Daarnaast is er een database opgebouwd voor volledige automatische analyse, eigenlijk een soort AI-gebaseerde benadering.

Hoewel flowcytometrie nog altijd één van de meest gangbare technieken is voor immunofenotypering en immuunmonitoring, is met het gebruik van omvangrijkere marker combinaties en de daarvoor noodzakelijk grotere aantallen fluorochromen, de spectrale overlap van de fluorochromen een steeds groter probleem. Massacytometrie (MC) gebruikt zware metalen als label in plaats van fluorochromen, en is daardoor in staat om een net zo groot aantal of meer markers te detecteren. Door de plastische aard van AMC en de grote overlap in marker-expressie is de MC techniek nuttig voor analyse van AMC. In **Hoofdstuk 6** vergelijken we spectrale flowcytometrie (SFC) met MC, gebruik makend van marker combinaties, die we specifiek ontwikkeld hebben voor de identificatie van AMC. Hoewel bij MC een groter celverlies ontstaat en een lager aantal cellen per tijdseenheid kan worden gemeten vergeleken met SFC, bleek de correlatie tussen de twee technieken goed, evenals de resolutie van de markerkleuringen.

Het doel van dit proefschrift was om de heterogeniteit, biologische functies en onderlinge relaties tussen alle bekende AMC-populaties in kaart te brengen (met speciale aandacht voor monocyten) in een gezond lichaam, om zo de basis te leggen voor toekomstige detectie van

afwijkingen. Om dit te kunnen doen, moesten veel technische uitdagingen worden opgelost:

1. De lage frequentie van veel AMC-populaties en de beperkte hoeveelheden celmateriaal (**Hoofdstukken 3 en 4**);
2. De noodzaak om MS-gebaseerde eiwitstudies te optimaliseren voor het bestuderen van de eiwitsamenstelling van weinig voorkomende, nauwverwante celpopulaties (**Hoofdstukken 2 en 3**);
3. Oplossen van tegenstrijdigheden in de selectie van markers voor het identificeren van AMC-populaties met behulp van cytometrie; en
4. Ontrafelen en ophelderen van de heterogeniteit van AMC-populaties, inclusief de inconsequente benamingen van populaties in verschillende studies (**Hoofdstukken 4, 5 en 6**).

Tot slot worden in **Hoofdstuk 7** onze bevindingen en conclusies besproken, en hoe deze bevindingen het gebruik van AMC in diagnostische patiëntenzorg kunnen bevorderen, door technische hindernissen te overwinnen en gebrek aan kennis aan te vullen.