

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/67101> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Unen, V. van

**Title:** Mucosal immunology revisited through mass cytometry : from biology to bioinformatics and back

**Issue Date:** 2018-11-27

## Nederlandse Samenvatting

### Het afweersysteem

Ons afweersysteem bestaat uit een gemengde verzameling van witte bloedcellen met verschillende functies. Er zijn bijvoorbeeld afweercellen die ziekmakende indringers herkennen, 'killercellen' die tumoren vernietigen, cellen die antistoffen maken en cellen die alle rommel opruimen. Dit is een kleine greep uit het volledige assortiment afweercellen, waarvan er miljoenen overal in ons lichaam actief zijn. Op basis van hun functie worden de afweercellen onderverdeeld in hoofdgroepen, zoals T-cellen, B-cellen, NK-cellen en myeloïde cellen. Binnen die hoofdgroepen onderscheiden we weer allemaal subgroepen.

Het verschil zit onder andere in de eiwitten aan de buitenkant van de cel. Die eiwitten bepalen aan welk soort cel de afweercel kan binden, waarmee hij kan communiceren of die hij kan doden. De afweercellen kunnen we karakteriseren door deze eiwitten te bestuderen.

### Chronische ontstekingsziekten in het darmstelsel

Het afweersysteem is noodzakelijk in de strijd tegen infecties die veroorzaakt worden door bacteriën, virussen of parasieten. Desalniettemin kan het afweersysteem ontsporen wat bijdraagt aan het ontstaan van (immuungerelateerde) ziekten als type I diabetes en reuma, maar ook chronische ziekten in het darmstelsel, zoals de ziekte van Crohn, ulceratieve colitis en coeliakie. Bij deze ziekten reageert het afweersysteem ten onrechte op bepaalde stoffen of valt het lichaamseigen weefsel aan.

Bij coeliakie zorgt het eten van gluten, dat onder andere in tarwe en andere granen zit, voor heftige ontstekingen in de dunne darm. Een levenslang, strikt glutenvrij dieet is de enige behandeling die we nu kennen. Sommige coeliakiepatiënten hebben milde symptomen, terwijl anderen zeer ernstige vormen ontwikkelen. Bij patiënten met de ziekte van Crohn of ulceratieve colitis reageert het afweersysteem in de darm overdreven sterk op onschadelijke bacteriën. Ook hier leidt dat tot ernstige, vaak chronische ontstekingen. De behandeling bestaat uit het toedienen van ontstekingsremmende medicijnen, maar lang niet alle patiënten reageren daar even goed op. Bij een kwart van de patiënten met de ziekte van Crohn zijn de ontstekingen dusdanig ernstig dat een operatie nodig is om de schade te herstellen. De toename in het voorkomen van deze ziekte bij jonge kinderen met vaak een agressiever

ziekteverloop is verontrustend. Waarom krijgt de één een ernstige vorm en de ander niet? Om te kunnen begrijpen hoe ziekten in/van het afweersysteem ontstaan en waarom we zulke grote verschillen zien tussen patiënten is het noodzakelijk dat de verschillende typen afweercellen in detail in kaart worden gebracht.

### **Massa cytometrie**

Met de nu gangbare methode “flow cytometrie” kunnen cellen van elkaar worden onderscheiden door er verschillende antilichamen aan toe te voegen. Deze hechten zich aan specifieke eiwitten (markers) op het celoppervlak. Deze markers bepalen de identiteit van de cel. Aan ieder antilichaam is een specifiek lichtgevend molecuul gekoppeld dat zichtbaar gemaakt kan worden in een flowcytometer. Maar er is een limiet: er kunnen niet meer dan 12 antilichamen tegelijkertijd gemeten worden, omdat de verschillende kleuren licht elkaar dan gaan overlappen.

Met massa cytometrie, of CyTOF, is de basis hetzelfde maar hier zijn antilichamen voor detectie gekoppeld aan metalen: elk antilichaam aan een ander metaal. Door te meten welke metalen zich aan een bepaalde cel gehecht hebben, weten we met welk type cel we te maken hebben. Voor het verkrijgen van deze meetgegevens gebruiken we een Massacytometer. In dit apparaat bevindt zich een gloeiendheet plasma met een temperatuur van 2.700 °C, equivalent aan de zon, dat cellen één-voor-één tot op atoomniveau uit elkaar doet spatten. Die metaalatomen hebben allemaal een verschillende massa en die verschillen worden heel nauwkeurig gemeten met een massaspectrometer. Deze nieuwe techniek is een grote verbetering ten opzichte van de gangbare methode (flow cytometrie). Met de CyTOF kunnen we nu drie keer zoveel celoppervlakmarkers tegelijk bepalen - momenteel 40 - en in de toekomst valt dat aantal zelfs nog uit te breiden naar meer dan honderd. Dat betekent weer een enorme toename in de mate waarin cellen verder van elkaar onderscheiden kunnen worden. De acquisitie van data gaat met een razend tempo van duizend cellen per seconde. Hiermee kunnen we dus snel van honderdduizenden afweercellen uit bijvoorbeeld het darmslijmvlies of bloed in detail karakteriseren. Concluderend kunnen we zeggen dat we met de CyTOF zeer uitgebreide celanalyses kunnen uitvoeren en zodoende de complexiteit van het afweersysteem in detail kunnen bestuderen.



## **Analyse van complexe CyTOF-gegevens**

De analyse in de eerste CyTOF studie naar diverse chronische darmziekten die wij hebben uitgevoerd hebben we gedaan met 5.2 miljoen cellen. In de tweede studie, specifiek gericht op de ziekte van Crohn en ulceratieve colitis konden we 8.9 miljoen cellen analyseren. Eén cel kan meerdere markers hebben en ook in een specifieke combinatie. Het vergt dus slimme datatechnieken om wijs te worden uit de gigantische hoeveelheid informatie die de CyTOF genereert. De methoden die er bestonden om de CyTOF data te analyseren waren nog zeer beperkt. Ze gaven een globaal beeld van alle cellen of ze gaven een gedetailleerd beeld van een willekeurig deel van de cellen. Soms maar 20%. Deze beperkingen in de analyse werden veroorzaakt door gebrek aan computerkracht. Het was daardoor onmogelijk om de verschillende cellen van elkaar te onderscheiden. Hierdoor werden onderzoekers gedwongen hun dataset te verkleinen en een willekeurig selectie van de totale hoeveelheid cellen te analyseren. Echter, de meest interessante celtypen in een weefselmonster, celtypen die te maken hebben met ziek of gezond zijn, zijn vaak zeldzaam en je mist ze als je slechts een deel van de cellen gedetailleerd bestudeert.

Een nieuwe analysetechniek genaamd *Hierarchical Stochastic Neighbour Embedding* (HSNE) die wij in samenwerking met computerwetenschappers van de Technische Universiteit Delft hebben ontwikkeld samen met de Cytosplore software, lost dat probleem op. De gebruiker krijgt eerst een tweedimensionaal plaatje op zijn computerscherm waarin de cellen uit het weefselmonster op basis van onderlinge gelijkenissen zijn gegroepeerd. De cellen staan er niet individueel in weergeven: dat zou resulteren in een onoverzichtelijke massa punten. In plaats daarvan zijn er 'landmarks', representatieve cellen die op elkaar lijkende cellen vertegenwoordigen. Dit overzicht laat de details weg, maar alle informatie is gebruikt om deze landmarks te berekenen. Vervolgens kan in stappen ingezoomd worden op een groep cellen naar keuze tot de individuele cellen met bijbehorende markers in beeld zijn. Het is te vergelijken met *Google Earth*, waar je begint met de hele aarde en kunt inzoomen tot de straat waar je woont. Deze interactieve, visuele, hiërarchische methodiek is gebruikersvriendelijk en werkt makkelijk, snel en goed. De landmarks vertegenwoordigen bekende hoofdgroepen van cellen, zoals (bepaalde) T-cellen en B-cellen van het afweersysteem. Door in te zoomen kun je zeldzamen celtypen ontdekken binnen deze hoofdgroepen die ontbreken of juist aanwezig zijn bij een bepaalde ziekte. Dat levert aanknopingspunten op voor het begrijpen van die ziekte, diagnostiek en doelgerichte behandeling.

## Identificatie van ziekte-geassocieerde afweercelpopulaties

Om de verschillen tussen de afweercellen van patiënten met chronische darmziekten in kaart te brengen hebben we (een set van) bloedmonsters en stukjes darmweefsels geanalyseerd met de CyTOF. In de eerste studie waren de monsters afkomstig van patiënten met verschillende stadia van coeliakie of Crohn en van een zogeheten controlegroep – mensen met darmklachten die een endoscopie (inwendig darmonderzoek) moesten ondergaan waaruit bleek dat er geen darmontsteking te vinden was. Een van de meest opvallende resultaten was het sterke verschil tussen bloed en darmweefsel. Zonder vooraf te weten welk monster gemeten was, maakte deze techniek probleemloos onderscheid tussen afweercellen uit bloed en uit darmweefsel. Een belangrijk resultaat, want het laat zien dat een bloedmonster zeer beperkt informatie geeft over wat er in het darmweefsel aan de hand is.

Verder bleek aan de hand van onze resultaten dat het afweersysteem veel complexer is dan gedacht. Een aantal soort cellen was al bekend, maar nu blijken het er nog veel meer te zijn. We vonden in totaal 142 verschillende subgroepen van afweercellen in de weefsels die we bestudeerden. Een belangrijke bevinding was dat we met deze methode scherp onderscheid konden maken tussen de verschillende groepen patiënten. De afweercellen uit het darmweefsel van coeliakiepatiënten vormden een duidelijk aparte groep, net als die van de ziekte van Crohn patiënten, anders dan in het darmslijmvlies van gezonde mensen. Ook konden we de verschillende stadia en complicaties eenvoudig van elkaar onderscheiden.

## Conclusie

De CyTOF studies hebben nieuwe inzichten gegeven in de betrokkenheid van afweercellen in chronische darmziekten. Deze verschillen in samenstelling van afweercellen tussen patiënten levert aangrijpingspunten om behandeling veel gericht op de individuele patiënt af te stemmen en zo de gezonde cellen met rust te laten. Daarnaast hebben we nu een stap gezet waarmee we de patiënten, na een behandeling bijvoorbeeld, in de loop van tijd kunnen volgen door de ziekte-specifieke abnormale cellen te volgen (immuno-monitoring). Wij verwachten dat de techniek toepassingen zal krijgen voor patiënten, voor het stellen van een diagnose en om vast te stellen of een behandeling het gewenste effect heeft.

