



## Samenvatting proefschrift W.W. Woud

“Fantastische vesikels en hoe ze te vinden”

**Promotie: 28 juni 2023**

**Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam**

**Promotor:**

Prof. dr. C.C. Baan

**Copromotores:**

Dr. M.J. Hoogduijn

Dr. ir. K. Boer

Extracellulaire vesikels (EVs) zijn minuscule (sub-micron) blaasjes die door alle cellen worden uitgescheiden en opgenomen. EVs hebben verschillende eiwitten op hun oppervlak (de buitenzijde) en ook een verscheidenheid aan macromoleculen als lading (aan de binnenzijde). Aangenomen wordt dat de combinatie van deze eiwitten en macromoleculen de status van de ouderlijke cel weerspiegelen. Als ‘momentopnames’ van cellen staan EVs steeds meer in de belangstelling als potentiële biomarkers voor verschillende ziekten. In de context van klinische niertransplantatie zou de status van de getransplanteerde nier wellicht kunnen worden afgeleid door EVs aanwezig in perfusievloeistoffen, bloedplasma of urine te analyseren.

De huidige gouden standaard voor de analyse van EVs in dergelijke (complexe) biologische monsters houdt in dat de EVs worden gescheiden van ‘niet-EVs’. In de praktijk is dit lastig omdat deze ‘niet-EVs’ verschillend zijn afhankelijk van het monster van interesse, terwijl de biofysische eigenschappen (bijv. grootte, dichtheid) van de ‘niet-EVs’ vaak overlappen met die van EVs. In de afgelopen jaren is het duidelijk geworden dat isolatiemethoden zoals ultracentrifugatie (de meest gebruikte EV-isolatiemethode tot nu toe) de eigenschappen van EVs kunnen veranderen, waardoor de analyse en gegevensinterpretatie worden beïnvloed. Naast ultracentrifugatie wordt er een verscheidenheid aan verschillende methoden gebruikt om EVs te isoleren en te analyseren, waardoor het EV-veld worstelt met de reproduceerbaarheid van EV-onderzoek. Dit laatste is een belangrijke vereiste voor het interpreteren van de biologische waarde van EVs.

Hoofdstuk 1 beschrijft deze uitdagingen, de beperkingen van de huidige EV-detectietechnieken, en identificeert de on vervulde behoefte aan een optimaal EV-analyseplatform. Dit analyseplatform moet nauwkeurig en reproduceerbaar individuele EVs kunnen kwantificeren en karakteriseren in complexe biologische monsters. Het hoofdstuk beschrijft vervolgens een aantal criteria waaraan dit EV-analyseplatform zou moeten voldoen, en presenteert Imaging Flow Cytometry (IFCM) als een potentiële techniek voor de analyse van individuele EVs in klinisch relevante biologische



monsters.

Voordat IFCM als potentieel EV-detectieplatform onderzocht wordt, beschrijft hoofdstuk 2 de kwantificering van nanodeeltjes in de perfusievloeistoffen van marginale (sub-optimale) donornieren tijdens normotherme machine perfusie (NMP). De term 'nanodeeltjes' wordt hier gebruikt om alle niet-gekaracteriseerde sub-micron deeltjes (inclusief, maar niet beperkt tot EVs) in een bepaald monster aan te duiden.

NMP is een experimentele orgaanconserveringstechniek waarbij een zuurstofrijke perfusievloeistof van 37 oC door de donornier wordt gepompt, met als doel het activeren van cellulair metabolisme. Duidelijk wordt dat marginale donornieren nanodeeltjes uitscheiden tijdens NMP. Het analyseplatform dat in deze experimenten wordt gebruikt (nanoparticle tracking analysis - NTA) heeft echter beperkte mogelijkheden om de vrijgekomen nanodeeltjes te karakteriseren, en is dus ongeschikt om te bevestigen dat deze nanodeeltjes werkelijk EVs zijn.

Hoofdstuk 3 presenteert, in overeenstemming met de in hoofdstuk 1 opgestelde criteria, een IFCM-methode voor de detectie van individuele EVs in plasmamonsters zonder dat isolatie van EVs nodig is ('directe-detectie'). Hierdoor is deze methode in staat om direct de status van een individu weer te geven, zoals weerspiegeld in EV-aantallen en aanwezigheid van specifieke eiwitten/moleculen aan de buitenzijde van de EVs. Dit biedt een voordeel bij het analyseren van EVs ten tijden van gezondheid en ziekte aangezien er geen EV modulatie plaats vindt d.m.v. EV isolatie. Omdat plasma wordt beschouwd als het meest complexe biologische monster met betrekking tot de detectie van individuele EVs, heeft deze methodologische ontwikkeling het potentieel om het EV-veld verder te brengen. Daarnaast laat dit hoofdstuk zien dat lichtverstrooiingssignalen gegenereerd door IFCM gecorreleerd kunnen worden aan deeltjesgrootte met behulp van Mie-theorie. Deze laatste ontwikkeling vertegenwoordigt een essentiële stap in de richting van de kalibratie van IFCM-lichtverstrooiingssignalen, waardoor de reproduceerbaarheid van EV-metingen wordt verbeterd. Al met al maakt de methode zoals beschreven in dit hoofdstuk de analyse van individuele EVs met een diameter  $\leq 400$  nm mogelijk in plasma monsters.

De directe-detectie van individuele EVs in urinemonsters vereist een aanpassing van de IFCM-methodologie aangezien 'auto-fluorescente' deeltjes in urine interfereren met EV-signalen (hoofdstuk 4). Aangevoerd werd dat deze deeltjes niet uit lipiden zijn opgebouwd aangezien de 'auto-fluorescente' signalen niet veranderden na behandeling met een detergent (gericht op het verbreken van lipide structuren). Om deze 'auto-fluorescente' deeltjes te verwijderen uit de analyse werd een strategie ontwikkeld waarbij signalen die representatief zijn voor urine EVs behouden blijven.

Hoofdstuk 5 keert terug naar de klinische setting van orgaanpreservatie met NMP (hoofdstuk 2). In een nieuw cohort van marginale donornieren vonden we opnieuw nanodeeltjes ( $<400$  nm in diameter) in de perfusievloeistoffen. Met behulp van de ontwikkelde IFCM-methodologie (hoofdstuk 3) wordt duidelijk dat 1) deze nanodeeltjes inderdaad representatief zijn voor EVs, 2) verschillende EV-subsets, te herkennen aan verschillende eiwitten op hun oppervlak, aanwezig zijn, en 3) dat



specifieke EV-subsets correleren met welbekende parameters van transplantatie uitkomst. Samengenomen suggereren deze bevindingen dat EVs nieuwe, potentiële biomarkers kunnen zijn om de kwaliteit van donornieren te beoordelen vóór de transplantatie.

Als eerste stap op weg naar klinische toepasbaarheid wordt in hoofdstuk 6 onderzocht of de ontwikkelde IFCM-methode in staat is om individuele, van donorweefsel afkomstige EVs te detecteren in plasmamonsters afgenomen van patienten vóór en na niertransplantatie. In dit 'naald-in-een-hooiberg'-scenario wordt duidelijk dat de IFCM-methode in staat is om 1) onderscheid te maken tussen EVs afkomstig van donoren en ontvangers door gebruik te maken van verschillen in HLA-moleculen, 2) donor-EVs te detecteren zijn tot ~1% boven de patiënt-specifieke achtergrondniveaus vóór transplantatie, en 3) donor-EVs te detecteren zijn (na transplantatie) boven deze achtergrondniveaus bij patienten met een stabiele transplantaatfunctie. Deze verhoging van donor-EVs werd niet waargenomen bij patienten die in verband met een achteruitgang in nierfunctie een nierbiopt kregen. Dit hoofdstuk demonstreert de toepasbaarheid van de ontwikkelde, gekalibreerde IFCM-methode ten behoeve van de directe-detectie van weefselspecifieke EV-subsets in klinisch relevante plasmamonsters.