

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/42846> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Wiekmeijer A.S.

Title: In vivo modelling of normal and pathological human T-cell development

Issue Date: 2016-09-08

Nederlandse samenvatting

Een enkele hematopoietische stamcel (HSC) kan door middel van zelfvernieuwing en differentiatie zorgen voor alle verschillende celtypen van het afweersysteem. De meeste van de verschillende typen afweercellen ontwikkelen zich in het beenmerg. Behalve de T-cellen, die hebben een gespecialiseerde omgeving nodig. Deze omgeving vinden zij in de thymus. De thymus is beter bekend als de zwezerik, een orgaan boven het hart dat kleiner wordt vanaf de puberteit. In dit orgaan worden de voorlopers van volwassen T-cellen opgeleid en geselecteerd. Cellen die geen antigenen herkennen of cellen die antigenen van het eigen lichaam herkennen worden daar verwijderd. Als dit niet gebeurt, dan zou dit leiden tot een sterk verhoogde incidentie van auto-immuunziekten, bijvoorbeeld diabetes. Tijdens ons leven hebben we T-cellen nodig om ons te beschermen tegen virusinfecties. Daarnaast helpen ze B-cellen om bacteriële infecties te voorkomen én kan hun respons gericht zijn tegen tumoren.

Een multipotente voorlopercel migreert vanuit het beenmerg, via de bloedsomloop, naar de thymus. Nadat hij daar aankomt, start de voorlopercel met delen (proliferatie) en ontwikkelt hij zich tot een meer volwassen celtype. Daarbij verliest hij geleidelijk zijn multipotentie. Door middel van verschillende signaleringen kunnen er verschillende ontwikkelpaden actief worden in de cel. Als de cel zich ontwikkelt tot een volwassen T-cel, herschikt hij verschillende stukken in het DNA die coderen voor de T-cel receptor. Deze receptor is nodig om antigenen te herkennen. Antigenen zijn stukjes eiwit die worden gepresenteerd door andere cellen aan de T-cel. Door het DNA dat codeert voor de T-cel receptor te herschikken, kan de grote diversiteit worden gegenereerd die nodig is om de vele verschillende antigenen van bijvoorbeeld virussen en bacteriën te kunnen herkennen. Dat zorgt dan weer voor een optimaal functionerend afweersysteem.

Nadat de multipotente voorlopercel is aangekomen in de thymus, begint hij zich te delen en te ontwikkelen (differentiatie) via verschillende stadia. De meeste kennis over deze differentiatie is afkomstig uit studies met muismodellen. Doordat er veel verschillende transgene muismodellen beschikbaar zijn, is het mogelijk om de rol van verschillende signaleringsroutes gedurende de T-cel ontwikkeling te bestuderen. De meerderheid van onze kennis over de ontwikkeling van T-cellen bij de mens komt uit beschrijvende studies. Hierbij wordt menselijk thymusweefsel bestudeerd. Dat gebeurt aan de hand van analyse van de aanwezigheid van verschillende celtypen en ontwikkelingsstadia en de expressie van genen in de verschillende celtypen. Deze studies en data afkomstig van proeven met cellen in kweekbakjes, worden beschreven in **hoofdstuk 1** van dit proefschrift.

Als we ziektes met problemen in de T-cel ontwikkeling bestuderen, zouden we meer inzicht kunnen krijgen in de ontwikkeling van deze T-cellen en de signaleringsroutes die een rol in spelen gedurende deze ontwikkeling. Dit soort ziektes zijn onder andere Severe Combined Immunodeficiency (SCID) en T-cel acute lymfoblastische leukemie (T-ALL). SCID is een ernstige aangeboren afwijking waarbij er geen functionele T-cellen aanwezig zijn in het bloed. Meestal wordt de diagnose in het eerste levensjaar gesteld. Onder andere doordat een kind veel infecties heeft en achterblijft in de groei. Momenteel zijn er zestien genen bekend die

SCID kunnen veroorzaken. Een mutatie in één van deze genen kan leiden tot een blokkade in de ontwikkeling van T-cellen. Wat kan leiden tot een T-cel deficiëntie. T-ALL is een vorm van leukemie waarbij er een kwaadaardige wildgroei is van T-cellen. Het is lastig om de mechanismes die aan deze twee vormen van pathologische T-cel ontwikkeling ten grondslag liggen te onderzoeken bij de mens. Dat komt doordat er geen biopten van de thymus worden genomen bij deze patiënten.

In **hoofdstuk 2** wordt een geoptimaliseerd gehumaniseerd muismodel beschreven dat gebruikt kan worden voor het *in vivo* bestuderen van T-cel ontwikkeling van menselijke cellen. Daarbij wordt gebruik gemaakt van een muis met een sterk verzwakt immuunsysteem: de NOD/Scid-Il2rg^{-/-} (NSG) muis. Deze muis heeft geen NK-cellen, B-cellen en T-cellen; celtypen die cruciaal zijn in een afweerreactie. Daardoor is dit type muis een goede ontvanger van menselijke cellen. In een gewone muis worden menselijke cellen afgestoten omdat de muis deze als indringer ziet. De NSG-muis doet dat niet omdat hij verschillende typen immuuncellen mist. Hierdoor is het mogelijk om de NSG muis te transplanteren met humane hematopoietische stam- en progenitorcellen (HSPC) zonder dat deze worden afgestoten. HSPC bestaan uit bloedstamcellen - de HSC - en multipotente voorlopercellen. Al deze cellen zijn te herkennen aan de expressie van CD34 op het celoppervlak. De HSPC werden geïsoleerd uit navelstrengbloed en werden kort gekweekt in het lab. Deze korte kweek maakt genetische modificatie mogelijk. Een ander voordeel van een korte kweek is dat de HSPC hun stamceleigenschappen behouden. Genetische modificatie is toegepast in **hoofdstuk 5 en 6** van dit proefschrift.

De data in **hoofdstuk 2** laat zien dat de kort gekweekte HSPC, na transplantatie in de NSG-muis, migreren naar het beenmerg en kunnen differentiëren in cellen van het menselijk immuunsysteem. De humane B- en T-cellen die zich in de muis ontwikkelen, zijn ook functioneel aangezien zij een afweerrespons laten zien tegen een lichaamsvreemd antigeen. Eén van de eigenschappen van een HSC is zelfvernieuwing. Deze capaciteit kan bepaald worden door het beenmerg van de ontvangende muis te isoleren en vervolgens te transplanteren in een andere muis. Daar moet zich dan weer een immuunsysteem ontwikkelen. Ook in het geoptimaliseerde model was het mogelijk om het beenmerg – dat humane HSC bevat – te transplanteren in een tweede muis. Dit toont aan dat de HSC niet verloren gaan of uitgeput raken. Ook was het mogelijk om, naast navelstrengbloed, HSPC te isoleren uit humaan beenmerg en te transplanteren in de NSG-muis. Daardoor is het mogelijk om patiëntmateriaal uit bio-banken in dit model te bestuderen. Dat kan omdat de thymus uit NSG-muizen getransplanteerd met humane cellen er erg vergelijkbaar uit ziet met humaan thymusmateriaal. En omdat het met het geoptimaliseerde protocol mogelijk is om HSPC uit menselijk beenmerg te transplanteren.

Patiëntmateriaal afkomstig uit een bio-bank is gebruikt in **hoofdstuk 3** om de blokkades in T-celontwikkeling voor verschillende typen SCID te onderzoeken. Bij de meeste SCID-patiënten worden geen biopten van de thymus genomen. Daardoor is niet bekend waar de blokkades in T-celontwikkeling precies liggen. Door muizen te bestuderen die hetzelfde gen missen, weten we in welk stadium de blokkades liggen in deze muizen. Maar het is lastig deze data te extrapoleren naar de mens. De data in **hoofdstuk 3** laat zien dat de blokkades in een vroeger stadium liggen dan voorspeld vanuit de muismodellen. Dit laat duidelijk de

verschillen in T-celontwikkeling zien tussen de muis en de mens. Met de verkregen data is een model opgesteld voor humane T-celontwikkeling. Dit model laat zien dat direct nadat een multipotente voorloper cel aankomt in de thymus deze gaat prolifereren onder invloed van cytokines (groeifactoren). Ook laat het model zien dat het punt van β -selectie – een belangrijk selectiepunt in T-cel ontwikkeling – in een eerder stadium plaats vindt dan eerder beschreven. Dit kon worden afgeleid uit het stadium waarin T-cel ontwikkeling blokkeert bij Artemis-SCID.

De hierboven beschreven studie laat duidelijk de kracht van het geoptimaliseerde gehumaniseerde muismodel zien bij het ontdekken van blokkades in T-cel ontwikkeling. In **hoofdstuk 4** wordt een patiënt beschreven met een atypische klinische presentatie van SCID. Door HSPC van deze patiënt in het muismodel te transplanteren, kon worden bevestigd dat deze patiënt inderdaad een TB⁺NK⁺-SCID patiënt was. De blokkade in de T-celontwikkeling lag in het CD4⁺CD8⁺ dubbel positieve stadium; het stadium waarin de T-cel selectie ondergaat via de T-cel receptor. Omdat in geen van de genen die geassocieerd zijn met SCID een mutatie kon worden ontdekt, is de genetische code van de exonen van alle genen van zowel de patiënt als beide ouders bepaald. Exonen zijn stukken DNA die coderen voor eiwitten en daarom zou een mutatie in deze gebieden kunnen leiden tot een eiwitverandering. Deze analyse leidde tot de detectie van een nieuwe mutatie in VPS4B in deze patiënt. Dit gen werd voorheen nog niet geassocieerd met SCID.

Hoofdstuk 5 beschrijft de beperking van het aantal hematopoietische klonen gedurende humane T-cel ontwikkeling. Door introductie van een unieke barcode in HSPC en transplantatie in NSG-muizen, kan het aantal klonen per ontwikkelingsstadium worden bestudeerd. Ondanks de sterke afname van het aantal hematopoietische klonen, ontstaat er wel een polykloonaal repertoire van verschillende T-cel receptoren. Dit laat zien dat een enkele hematopoietische kloon kan uitgroeien in meerdere T-cel klonen. Een grote verscheidenheid aan T-cel klonen is nodig om een goede afweerrespons te kunnen maken tegen de verschillende ziekteverwekkers die wij dagelijks tegenkomen.

In tegenstelling tot **hoofdstuk 3 en 4**, waarin gendeficiënties zijn onderzocht, is in **hoofdstuk 6** het effect van een te hoge expressie van het LMO2-gen onderzocht op humane T-cel ontwikkeling. LMO2 is een oncogen dat vaak tot verhoogde expressie komt in T-ALL. Ook in klinische trials voor genterapie voor immundeficiënties ontwikkelden een aantal patiënten T-ALL als gevolg van insertionele mutagenese. Vaak was de insertie van de therapeutische vector in het DNA in de buurt van het LMO2-gen. Dat kwam daardoor tot verhoogde expressie en dat kan leiden tot T-ALL. Transgene muismodellen voor Lmo2 laten een blokkade in T-celontwikkeling zien in een vroeg stadium. Verder laten deze muismodellen zien dat de muizen leukemie ontwikkelen als zij ongeveer één jaar oud zijn. Het effect van LMO2 op humane T-celontwikkeling werd onderzocht door LMO2 tot overexpressie te brengen in humane HSPC. Deze HSPC waren geïsoleerd uit navelstrengbloed en vervolgens getransplanteerd in het gehumaniseerde muismodel. Deze transplantatie toonde aan dat LMO2 via drie verschillende mechanismen kan zorgen voor deregulatie van humane T-celontwikkeling; een vertraagde

ontwikkeling zoals ook geobserveerd in transgene muizen en in kweekbakjes, een accumulatie van CD4⁺CD8⁺ dubbel positieve cellen en een versnelde ontwikkeling die resulteerde in een verhoogde frequentie van T-cellen in het bloed.

Kort samengevat beschrijft dit proefschrift nieuwe inzichten in humane T-cel ontwikkeling door middel van transplantatie van humane HSPC in muizen met een sterk verzwakt immuunsysteem. Het geoptimaliseerde ghumaniseerde muismodel kan verder worden gebruikt in fundamentele studies naar de ontwikkeling van T-cellen en voor optimalisatie van strategieën voor gentherapie en stamcelexpansie protocollen. Verder illustreert het (zie **hoofdstuk 7**) de noodzaak voor een beter begrip van en meer inzicht in humane T-cel ontwikkeling. Dit kan helpen om de uitgroei van T-cellen na stamceltransplantatie te verbeteren. Daarnaast kan het helpen bij de diagnose en toekomstige behandeling van patiënten met T-ALL.