



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mapping the pathogenesis of immune-mediated aplastic anemia: filling the gaps

Pool, E.S.

Citation

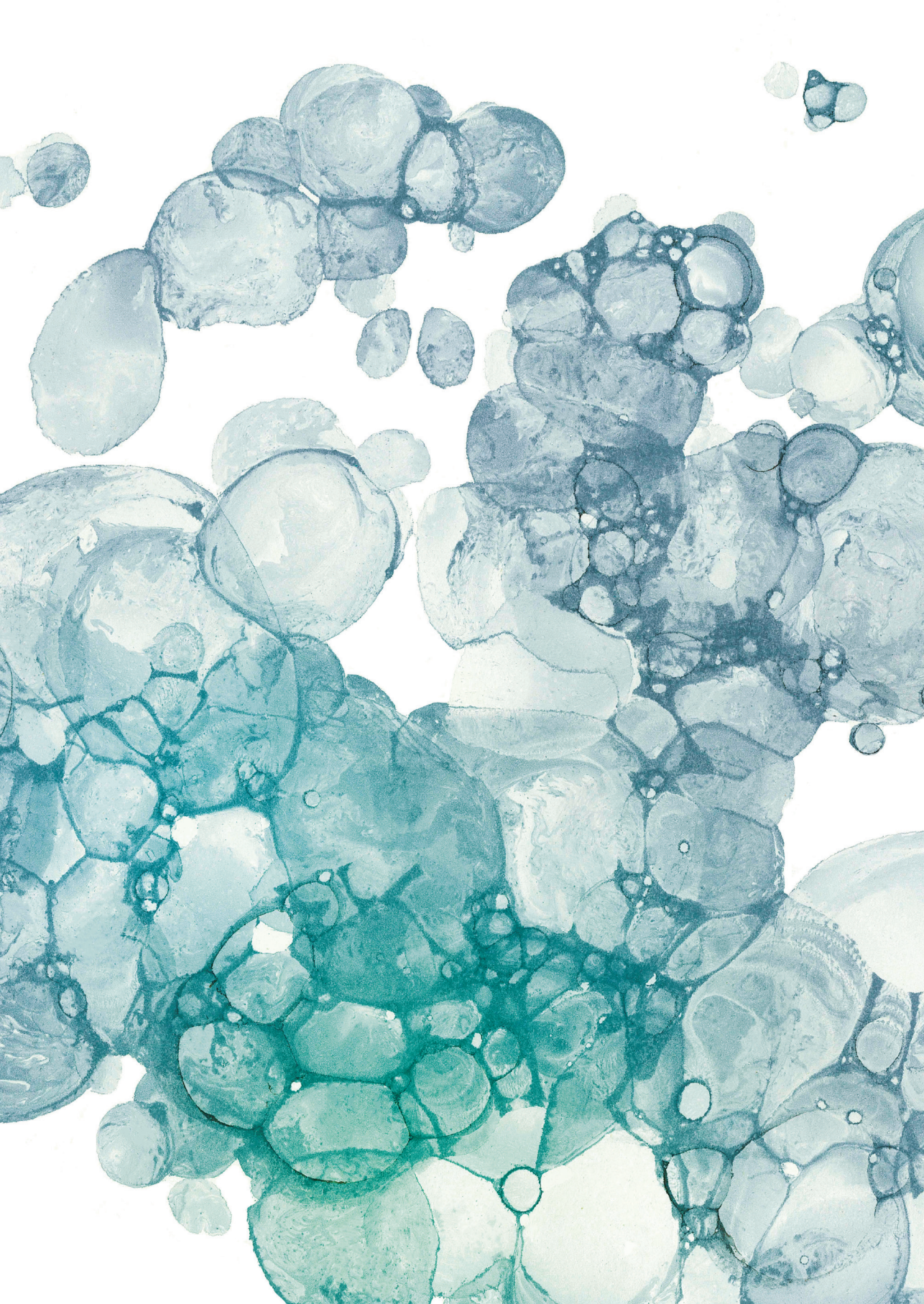
Pool, E. S. (2026, September 24). *Mapping the pathogenesis of immune-mediated aplastic anemia: filling the gaps*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4310129>

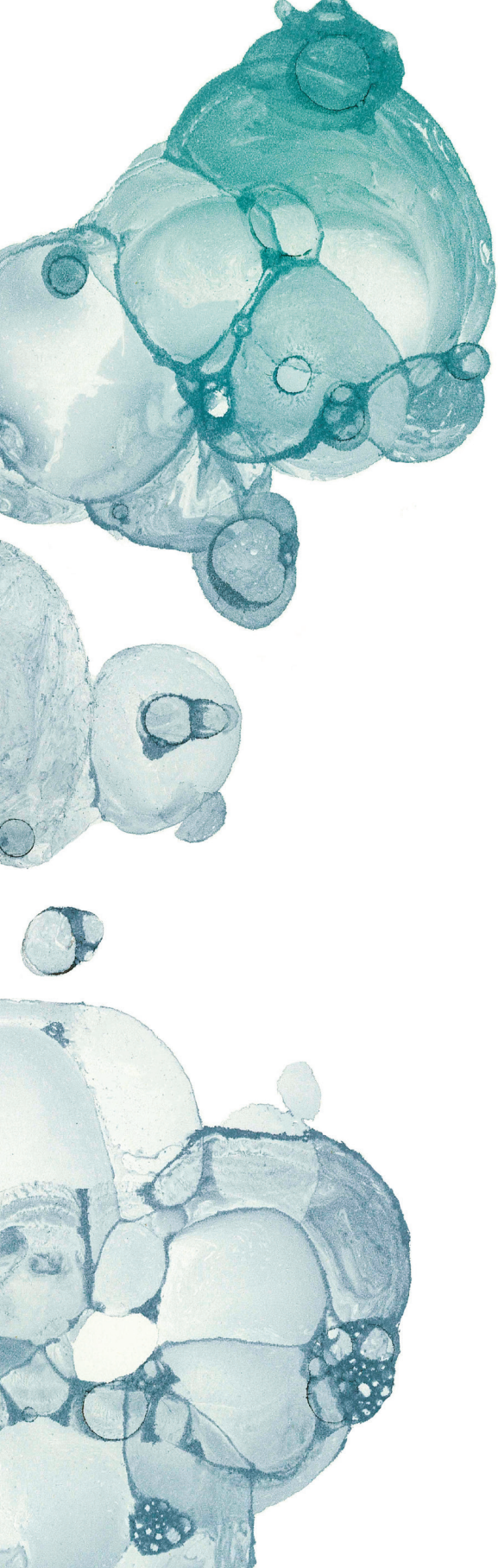
Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4310129>

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





Appendices

Nederlandse samenvatting
About the author
List of publications
Acknowledgements / Dankwoord

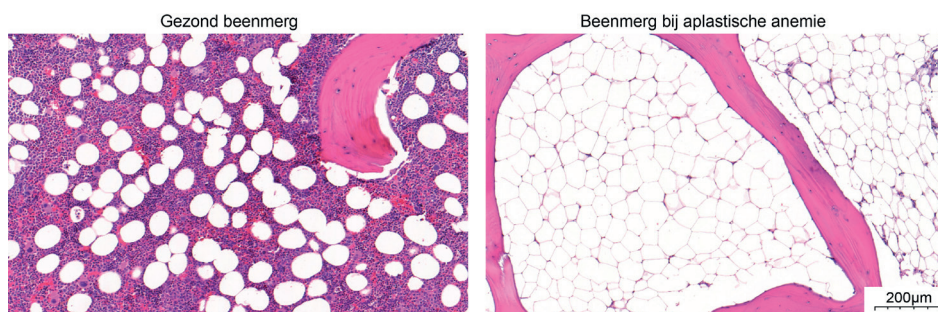
A

Nederlandse samenvatting

Immuun-gemedieerde aplastische anemie: een zeldzame ziekte met veel vraagtekens

Het beenmerg is het belangrijkste orgaan voor de productie van bloed. Het beenmerg produceert rode bloedcellen, witte bloedcellen en bloedplaatjes, die respectievelijk belangrijk zijn voor zuurstoftransport, afweer tegen ziekteverwekkers en wondheling. Aan de basis van de bloedproductie staan de hematopoietische stamcellen; de 'oercellen' waaruit alle typen bloedcellen ontstaan.

Indien het beenmerg onvoldoende rode bloedcellen, witte bloedcellen en/of bloedplaatjes produceert, kan er sprake zijn van beenmergfalen. Immuun-gemedieerde aplastische anemie (AA) is een ernstige, verworven vorm van beenmergfalen dat op elke leeftijd kan ontstaan. AA wordt gekenmerkt door een beenmerg met een gatenkaasstructuur. In dit 'lege' beenmerg is het bloedproducerende (hematopoietische) weefsel (roze/paars vlakken) vervangen door vet (witte bollen; zie figuur hieronder). Deze lege structuur lijkt met wat fantasie op de afbeelding die is weergegeven op de kaft van dit proefschrift. Het gevolg van dit lege beenmerg is een sterk verminderde productie van alle bloedcellen, wat kan leiden tot vermoeidheid, kortademigheid en potentieel levensbedreigende infecties en bloedingen.



AA is een zeldzame aandoening en treft in Nederland jaarlijks ongeveer 50 volwassenen. Een groot deel van deze patiënten wordt behandeld in het nationaal expertisecentrum voor zeldzaam beenmergfalen in het Leids Universitair Medisch Centrum. Voor de meeste patiënten bestaat de standaardbehandeling uit afweeronderdrukkende medicatie: een korte kuur met anti-thymocyteglobuline, gevolgd door langdurig gebruik van ciclosporine. Deze behandeling kan leiden tot herstel van het beenmerg, maar het is nog niet duidelijk hoe de therapie precies werkt. Daarnaast is de behandeling niet specifiek, gaat het gepaard met bijwerkingen en leidt het slechts bij een minderheid van de patiënten tot volledig herstel. Hierdoor bestaat er een grote behoefte aan betere en gerichtere behandelingen.

Wat veroorzaakt immuun-gemedieerde aplastische anemie?

Vanwege de zeldzaamheid van AA wordt er wereldwijd relatief weinig onderzoek gedaan naar deze aandoening. Hierdoor is de exacte oorzaak van de ziekte nog steeds onbekend en is het momenteel niet mogelijk om nieuwe, gerichte behandelingen te ontwikkelen. Omdat een deel van de patiënten herstelt na behandeling met afweeronderdrukkende medicatie, wordt aangenomen dat AA een auto-immuunziekte is. Hierbij valt het immuunsysteem vermoedelijk per ongeluk de stamcellen in het beenmerg aan.

Vooraf T-cellen lijken hierbij een belangrijke rol te spelen. Dit zijn afweercellen die normaal gesproken helpen bij de bestrijding van ziekteverwekkers, maar in sommige gevallen ook onbedoeld lichaamseigen cellen kunnen aanvallen. Daarnaast zijn er aanwijzingen dat ook andere typen afweercellen betrokken kunnen zijn bij het ontstaan van AA. Zo zouden B-cellen, die ons normaal gesproken beschermen tegen ziekteverwekkers door het maken van antilichamen, mogelijk kunnen bijdragen aan het doden van de stamcellen in het beenmerg.

Hoewel deze aanwijzingen bestaan, ontbreekt tot op heden een volledig beeld van de auto-immuunrespons bij AA. Dit wordt deels veroorzaakt door het beperkte beschikbare onderzoeksmateriaal. Patiënten met AA hebben sterk verlaagde bloedwaarden, waardoor slechts kleine hoeveelheden bloed kunnen worden afgenomen voor onderzoek. Beenmergmateriaal is nog schaarser en moeilijker te verkrijgen. Hierdoor zijn de enkele gepubliceerde studies noodgedwongen uitgevoerd met het perifere bloed, terwijl de ziekteprocessen zich juist in het beenmerg afspelen. Daarnaast maken de gangbare onderzoekstechnieken het slechts mogelijk om een beperkt aantal typen afweercellen tegelijk te bestuderen, waardoor belangrijke onderdelen van de immuunrespons buiten beeld zijn gebleven. Als gevolg hiervan is de aanwezigheid en rol van mogelijk ziekmakende afweercellen in het doelwitorgaan zelf, het beenmerg, grotendeels onbekend gebleven.

Doel van dit proefschrift

Het doel van dit proefschrift was om beter te begrijpen hoe de auto-immuunreactie bij AA verloopt en welke afweercellen daarbij betrokken zijn. Hiermee werd een basis gelegd voor het identificeren van mogelijke aanknopingspunten voor de ontwikkeling van meer specifieke behandelingen voor AA in de toekomst.

Om dit te bereiken, maakten we gebruik van geavanceerde laboratoriumtechnieken, zoals (imaging) massacytometrie en (spectrale) flowcytometrie. Deze methoden maken het mogelijk om veel verschillende typen afweercellen gelijktijdig te bestuderen. In tegenstelling tot gangbare analysemethoden kunnen met deze technieken tot wel 40 ceileigenschappen tegelijk worden gemeten, waardoor zowel veelvoorkomende als zeldzamere afweercelpopulaties

gedetailleerd in kaart kunnen worden gebracht. In dit proefschrift pasten we deze methoden toe op zowel vloeibare beenmergmonsters als vaste beenmergbipten van patiënten met AA. Dit unieke materiaal was beschikbaar dankzij de rol van het Leids Universitair Medisch Centrum als nationaal expertisecentrum. Hierdoor kon voor het eerst de auto-immunreactie in het beenmerg bij AA uitgebreid worden bestudeerd.

Welke afweercellen zijn betrokken bij het ontstaan van aplastische anemie?

In **Hoofdstuk 2** onderzochten we met behulp van massacytometrie hoe het afweersysteem in vloeibare beenmergmonsters van patiënten met AA eruitziet. Dit maakte het mogelijk om voor het eerst een gedetailleerd overzicht te krijgen van het immuunsysteem bij deze ziekte.

We vonden dat de samenstelling van het immuunsysteem in het beenmerg van AA patiënten duidelijk afwijkt van die van gezonde donoren. Zo waren de cellen die nodig zijn voor een normale bloedproductie sterk verminderd, terwijl bepaalde afweercellen juist vaker voorkwamen. Door het immuunsysteem vervolgens verder in detail te analyseren, konden we een netwerk aan afweercellen identificeren dat mogelijk een rol speelt in het ziekteproces van AA. Specifiek bestond dit netwerk uit CD16⁺ myeloïde cellen, CCR6⁺ B-cellen, CCR6⁺ geheugen CD4⁺ T-cellen en KLRG1⁺ terminaal gedifferentieerde geheugen CD8⁺ T-cellen. Deze afweercellen zijn bekend uit andere auto-immuunziekten en worden geassocieerd met chronische ontstekingsreacties. Zij kwamen vooral voor bij patiënten op het moment van diagnose en namen af na succesvolle behandeling. Dit suggereert dat deze afweercellen betrokken zijn bij het ontstaan of in stand houden van AA. Samenvattend bieden onze resultaten een unieke atlas van het immuunsysteem in het beenmerg bij AA en identificeren we het celoppervlakteiwit CCR6 als mogelijke aangrijpingspunt voor toekomstige therapieën. Deze bevindingen vormden de basis voor nieuwe onderzoeksvragen die in **Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 4** verder zijn onderzocht.

Hoe verloopt het ontstaan van aplastische anemie precies?

Hoewel de analyse van vloeibare beenmergmonsters in **Hoofdstuk 2** essentieel is om ziekmakende afweercellen bij AA te identificeren, blijft hierbij onbekend hoe deze afweercellen zich tot elkaar verhouden en met elkaar communiceren binnen het beenmergweefsel.

In **Hoofdstuk 3** onderzochten we daarom de autoimmuunreactie bij AA in een ruimtelijke context, door afweercellen in de ruimtelijke architectuur van het beenmergweefsel in beeld te brengen. Met behulp van imaging massacytometrie konden we bestuderen waar in het beenmerg de immunreactie plaatsvindt en hoe verschillende celtypen met elkaar in contact staan. We zagen dat de actieve immunreactie zich concentreert in zogeheten

immuun 'hotspots': specifieke gebieden in het beenmerg waar voorlopercellen nog aanwezig zijn. Onze resultaten suggereren dat de ziekte begint in immuun hotspots die verrijkt zijn in lymfoïde afweercellen. Hier brengen interacties tussen T- en B-cellen, waaronder de CCR6⁺ B-cellen en CCR6⁺ geheugen CD4⁺ T-cellen geïdentificeerd in **Hoofdstuk 2**, de immuunreactie op gang. Naarmate de ziekte vordert, veranderen deze hotspots van samenstelling en verschijnen er ook geactiveerde macrofagen. Deze afweercellen hebben de unieke taak om beschadigde of dode cellen op te ruimen en lijken betrokken te zijn bij het verwijderen van afgestorven cellen. Wanneer uiteindelijk alle voorlopercellen zijn verdwenen en de actieve immuunreactie is uitgedoofd, blijven de terminaal gedifferentieerde geheugen CD8⁺ T-cellen uit **Hoofdstuk 2** en plasmacellen achter in het lege beenmerg.

Samenvattend visualiseert dit hoofdstuk voor het eerst de immuunrespons tijdens de ontwikkeling van AA, en toont het aan welke afweercellen bij ieder ziektestadium betrokken zijn. Deze bevindingen bevestigen de relevantie van de afweercellen geïdentificeerd in **Hoofdstuk 2**. Daarnaast illustreren deze resultaten dat de immuunreactie in AA wordt gevormd door een spectrum aan afweercellen, met een rol voor meer typen afweercellen dan alleen T-cellen.

A

Waarom werkt afweeronderdrukkende medicatie soms bij aplastische anemie?

Om de behandeling van AA in de toekomst te verbeteren, is het naast het identificeren van mogelijke aangrijpingspunten ook belangrijk om te begrijpen hoe en waarom de huidige behandeling bij een deel van de patiënten effectief is. Het wordt verondersteld dat de afweeronderdrukkende therapie werkt door het uitschakelen van afweercellen die het beenmerg aanvallen. De vierdaagse behandeling met paarden antithymocytenoglobuline leidt hierbij mogelijk tot een snelle afname van afweercellen, met name T-cellen. Het langdurige gebruik van ciclosporine zou vervolgens voorkomen dat overgebleven ziekmakende afweercellen opnieuw actief worden. Het exacte werkingsmechanisme van deze behandeling bij AA is echter onbekend. Hierdoor is het op dit moment onduidelijk welke afweercellen de meest geschikte doelwitten zijn voor meer specifieke therapieën.

In **Hoofdstuk 4** brachten we het effect in kaart van de afweeronderdrukkende therapie, bestaande uit een korte kuur paarden antithymocytenoglobuline (commercieel verkrijgbaar als ATGAM), gevolgd door langdurig gebruik van ciclosporine. ATGAM is een geneesmiddel dat bestaat uit antilichamen die in paarden worden aangemaakt nadat zij zijn blootgesteld aan cellen van een menselijke thymus (zwezerik). Omdat dit middel van dierlijke oorsprong is en de thymus naast afweercellen ook andere typen cellen bevat, kan slechts een klein deel van deze antilichamen aan menselijke afweercellen binden en uitschakelen.

Met behulp van (spectrale) flowcytometrie onderzochten we in **Hoofdstuk 4** specifiek het effect van dit actieve deel van ATGAM dat kan binden aan menselijke afweercellen. We vonden dat de blootstelling aan actief ATGAM sterk verschilt tussen patiënten ondanks dosering volgens de internationale richtlijnen. Deze verschillen lijken van invloed te zijn op hoe snel de bloedproductie herstelt na de start van de behandeling. Daarnaast vonden we dat ATGAM direct na toediening leidt tot een snelle, maar kortdurende afname van afweercellen, met verschillende effecten per type afweercel. Hoewel actief ATGAM kan binden aan alle typen lymfoïde cellen, leidt dit alleen tot een afname van T- en NK-cellen. Opmerkelijk is dat B-cellen niet worden verminderd, maar juist tekenen van activatie vertonen.

Om het langdurige therapeutische effect van ATGAM plus ciclosporine op te helderen, analyseerden we de T-, NK- en B-cellen in meer detail op subpopulativeniveau. We vonden dat ATGAM verantwoordelijk is voor een snelle depletie van T-celtypen, waaronder de KLRG1⁺ terminaal gedifferentieerde geheugen CD8⁺ T-cellen uit **Hoofdstuk 2**. Het daaropvolgende langdurige gebruik van ciclosporine leidt tot een selectieve vermindering van de CCR6⁺ Bcellen en CCR6⁺ geheugen CD4⁺ T-cellen uit **Hoofdstuk 2**. Opmerkelijk is dat andere T-cellen die verantwoordelijk zijn voor de bescherming tegen virusinfecties na de start van de behandeling deels behouden lijken te blijven. Deze bevindingen suggereren dat succesvolle behandeling van AA niet afhankelijk is van een volledige herstart van het immuunsysteem, maar eerder het gevolg is van een combinatie van depletie en onderdrukking van resterende, potentieel ziekte veroorzakende afweercellen, waaronder de afweercellen geïdentificeerd in **Hoofdstuk 2**. Dit bevestigt deze celtypen als potentiële aangrijpingspunten voor de ontwikkeling van meer specifieke therapieën voor AA.

Hoe kan leukemie ontstaan na aplastische anemie?

Zelfs bij patiënten met AA die goed reageren op de afweeronderdrukkende behandeling, kunnen op de lange termijn ernstige complicaties optreden. Eén van deze mogelijke complicaties is het ontstaan van leukemie. Leukemie is een vorm van bloedkanker die ontstaat uit afwijkende bloedvormende stamcellen in het beenmerg en ontwikkelt zich bij ongeveer 10-15% van de AA patiënten binnen tien jaar na behandeling.

Er zijn verschillende verklaringen voorgesteld voor het verhoogde risico op het ontstaan van leukemie na AA. Ten eerste kan het zijn dat afwijkende stamcellen een groeivoordeel hebben ten opzichte van andere stamcellen in het lege beenmerg van AA patiënten na behandeling. Ten tweede wordt gedacht dat afwijkende stamcellen de autoimmunreactie bij AA mogelijk beter kunnen overleven, waardoor zij het beenmerg na verloop van tijd kunnen overnemen.

Waarom slechts een deel van de AA patiënten leukemie ontwikkelt is echter nog onbekend. Ook is het onduidelijk hoe deze ziekte zich in een vroeg stadium in het beenmerg ontwikkelt. Hierdoor is het niet mogelijk om dit verloop te voorspellen en wordt leukemie doorgaans pas gediagnosticeerd wanneer klachten optreden.

In **Hoofdstuk 5** is aan de hand van een patiëntcasus de ontwikkeling van leukemie na succesvolle behandeling van AA in detail bestudeerd. Met behulp van imaging massacytometrie analyseerden we een unieke reeks beenmergbipten van één patiënt, afgenomen bij de diagnose van AA, na start van de afweeronderdrukkende behandeling en bij de latere diagnose van leukemie. Hierdoor konden we voor het eerst de ontwikkeling van leukemie stap voor stap visualiseren in het beenmergweefsel.

We vonden dat het ontstaan van leukemie in de beschreven patiënt gepaard ging met een sterke toename van onrijpe myeloïde cellen, die geleidelijk de normale bloedproductie verdrongen. Opmerkelijk was dat deze afwijkende cellen gebaseerd op hun uiterlijk (fenotype) al aanwezig leken te zijn op het moment van de oorspronkelijke diagnose van AA. Hun abnormale groei in het beenmerg kon bovendien worden waargenomen ruim voordat de genetische veranderingen die kenmerkend zijn voor leukemie aantoonbaar waren.

Daarnaast liet aanvullend genetisch onderzoek zien dat deze patiënt al bij de diagnose van AA een verworven genetische verandering had in het spliceosoomgen *ZRSR2*, dat betrokken is bij de verwerking van RNA en de aanmaak van eiwitten. Dit wijst mogelijk op een kwetsbaarheid in de bloedvormende stamcellen. Op basis van deze observaties veronderstellen wij dat de ontwikkeling van leukemie in deze casus mogelijk het gevolg was van veranderingen in de micro-omgeving van het beenmerg na succesvolle afweeronderdrukkende behandeling en/of van een verhoogde instabiliteit van de stamcellen als gevolg van de *ZRSR2* mutatie. Deze bevindingen suggereren dat het ontstaan van leukemie na AA in sommige gevallen anders kan verlopen dan tot nu toe werd aangenomen, en bieden aanknopingspunten voor toekomstig onderzoek naar het vroeg herkennen en voorkomen van bloedkanker na AA.

Conclusie en toekomstperspectief

Wat hebben we geleerd door dit proefschrift?

Samenvattend biedt dit proefschrift tot op heden het meest gedetailleerde overzicht van het immuunsysteem bij AA, zowel voor als na behandeling met afweeronderdrukkende medicatie. Door geavanceerde technieken toe te passen op het beenmerg van AA patiënten, hebben we aangetoond dat AA het gevolg is van een gecoördineerde immuunreactie die wordt gevormd door meerdere typen afweercellen. Daarmee laten onze resultaten zien dat AA niet uitsluitend wordt aangedreven door T-cellen, maar door een breder spectrum aan afweerceltypen.

Op basis van onze bevindingen beschouwen wij met name CCR6⁺ B-cellen, CCR6⁺ geheugen CD4⁺ T-cellen en KLRG1⁺ terminaal gedifferentieerde geheugen CD8⁺ T-cellen als belangrijke effectorcellen in het ziekteproces. Deze subpopulaties vormen daarmee veelbelovende aanknopingspunten voor de ontwikkeling van meer gerichte en mogelijk effectievere therapieën voor AA.

Hoe nu verder?

Hoewel dit proefschrift belangrijke nieuwe inzichten oplevert, is aanvullend onderzoek nodig om de precieze functionele rol van deze B- en T-celpopulaties beter te begrijpen. Met name het bestuderen van hun antigeenspecificiteit kan helpen om te achterhalen welke structuren op de bloedvormende stamcellen precies door het immuunsysteem worden herkend. Dit onderzoek vormt een logische vervolgstap op de bevindingen uit dit proefschrift en is essentieel voor de ontwikkeling van meer specifieke therapieën. Het vervolgonderzoek wordt momenteel uitgevoerd op het laboratorium van de afdeling Hematologie van het Leids Universitair Medisch Centrum.