

University of Groningen

Genetic defects in myeloid malignancies and preleukemic conditions

Berger, Gerbrig

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Berger, G. (2019). *Genetic defects in myeloid malignancies and preleukemic conditions*. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Appendices

Nederlandse samenvatting
Dankwoord
Over de auteur
Publicaties

Nederlandse samenvatting

Myeloïde neoplasmata (MN's) is een verzamelterm voor kwaadaardige bloedziekten die effect hebben op de myeloïde uitrijping van het bloedvormende systeem in het beenmerg. MN's resulteren in tekorten van functioneel uitgerijpte bloedcellen - de afweercellen, rode bloedcellen en bloedplaatjes - met een verstoorde immuniteit, verminderd zuurstoftransport en bloedingen tot gevolg. Soms is er sprake van een uitrijpingsstop in de voorlopercellen (blasten) met accumulatie van deze immature blast cellen in het beenmerg tot gevolg. Op basis van het percentage blasten kan een onderscheid gemaakt worden tussen acute myeloïde leukemie (AML) en myelodysplastisch syndroom (MDS). Beide ziekten kunnen zich zowel klinisch als biologisch heel verschillend presenteren en een deel van deze heterogeniteit kan verklaard worden vanuit de aanwezigheid van verschillende defecten op DNA niveau. Door de introductie van nieuwe sequencing technieken is de laatste jaren veel bekend geworden over genetische defecten die vaak voorkomen in MN's. In dit proefschrift hebben we ons gefocust op de consequenties van deze genetische defecten in preleukemische stadia. Verder hebben we de invloed van individuele genetische defecten op het MN fenotype, de handhaving van de ziekte en respons op therapie onderzocht.

Therapie-gerelateerde myeloïde neoplasmata (t-MN's) zijn kwaadaardige bloedziekten die ontstaan na behandeling met chemotherapie en radiotherapie. Ondanks de duidelijke etiologie van t-MN's werd het mechanisme waarmee een cytotoxische behandeling kan resulteren in leukemie nog grotendeels onbegrepen. De ontwikkeling van t-MN komt relatief frequent voor

na behandeling met een autologe stamceltransplantatie (SCT). De regelmatige follow-up van patiënten na behandeling met een autologe SCT maakt dat deze groep een uniek model vormt voor de bestudering van premaligne gebeurtenissen vóórdat de diagnose t-MN wordt gesteld. In **hoofdstuk 2** hebben we een cohort van 18 patiënten onderzocht die werden gediagnosticeerd met t-MN na behandeling met een autologe SCT vanwege lymfoom of plasmaceldyscrasie. Whole exome sequencing (WES) toonde aan dat t-MN's worden gekenmerkt door frequente mutaties in het *TP53* gen en een hoog aantal mutaties vergeleken met niet therapie-gerelateerde leukemie. Van dit verhoogd aantal mutaties werd slechts een laag aandeel verklaard door veroudering. Zeer gevoelige sequencing van de mutaties die ten tijde van de t-MN diagnose werden geïdentificeerd, onthulde dat dezelfde mutaties al aanwezig zijn in lage frequenties op het moment van transplantatie in 70 procent van de patiënten. De bevinding dat leukemie-gerelateerde mutaties in sommige gevallen ook aanwezig waren in T-cellen ten tijde van de t-MN diagnose, suggereert dat de leukemie is ontstaan uit een vroege hematopoietische stamcel. Echter het gebrek aan overlap tussen de mutaties die gedetecteerd zijn in het lymfoommateriaal en het t-MN materiaal wijst niet op het bestaan van een gemeenschappelijke voorloper cel die ten grondslag ligt aan beide ziekten. Door middel van gevoelige en gerichte sequencing van materiaal dat verkregen is op verschillende preleukemische tijdstippen werd de dynamiek van de gevonden mutaties bestudeerd. Reconstructie toonde dat preleukemische klonen jarenlang vóór de t-MN diagnose aanwezig kunnen zijn en dat behandeling na de autologe SCT van invloed kan zijn op de stabiliteit van deze klonen. Deze resultaten konden worden bevestigd

met behulp van immunohistochemie waarmee p53-eiwitexpressie werd gedetecteerd. De resultaten beschreven in hoofdstuk 2 suggereren dat de cellen die ten grondslag liggen aan t-MN al in een vroeg stadium kunnen worden gedetecteerd. Deze bevinding kan verregaande implicaties hebben voor patiëntenzorg in de toekomst, bijvoorbeeld voor het monitoren van patiënten en aanpassing van de behandeling.

Ringsideroblasten (RS) zijn afwijkende erythroïde voorlopercellen die frequent worden waargenomen in het beenmerg van patiënten met een MDS of MDS/MPN (myeloproliferatieve aandoening) mengbeeld, voornamelijk in de subtypes met een laag risico op transformatie naar een AML. De aanwezigheid van RS in MDS is sterk geassocieerd met de aanwezigheid van mutaties in het *SF3B1* gen, welke een rol speelt in regulatie van messenger RNA (mRNA) expressie door middel van splicing. Gedacht wordt dat RS in MDS het gevolg zijn van afwijkende splicing van genen die betrokken zijn bij de erythroïde uitrijping en het heem metabolisme als resultaat van deze *SF3B1* mutaties. RS kunnen echter ook worden waargenomen in het beenmerg van patiënten met een hoog-risico MDS of AML, welke doorgaans worden gekarakteriseerd door een slechte prognose en waarin *SF3B1* mutaties zeldzaam zijn. In **hoofdstuk 3** werd het RS fenotype in AML bestudeerd om inzicht te krijgen in de genetische achtergrond en de mogelijke mechanismen die ten grondslag liggen aan deze bevinding. Met dit doel werd een cohort bestaande uit 126 AML en hoog-risico MDS patiënten met RS geanalyseerd. Een hoog percentage RS werd voornamelijk waargenomen in patiënten met slecht-risico ziektekenmerken, inclusief aanwezigheid van specifieke cytogenetische afwijkingen en

frequente *TP53* mutaties. De afwijkende erythroïde uitrijpende cellen bevatten dezelfde mutaties als de myeloïde leukemische kloon, wat duidt op een gemeenschappelijke herkomst voor beide afwijkende. RNA sequencing toonde aan dat RS-AML, in vergelijking met een afzonderlijk AML cohort, wordt gekenmerkt door een verhoogde expressie van genen die betrokken zijn bij megakaryocytaire en erythroïde differentiatie en mRNA splicing. Ook genen die betrokken zijn bij het heem metabolisme kwamen verhoogd tot expressie in RS-AML. Deze genen vertoonden overlap met de genen die verhoogd tot expressie komen in MDS met *SF3B1* mutaties. Hoofdstuk 3 toont aan dat de genetische basis voor het RS-fenotype in AML verschilt van die in MDS, maar dat onderliggende mechanismen overeenkomsten vertonen.

De introductie van nieuwe sequencing methoden heeft ook geleid tot een toename van de belangstelling voor de waarde van individuele mutaties voor bijvoorbeeld risicostratificatie en de respons op therapieën. MN's met mutaties in *TP53* zijn berucht vanwege de slechte respons op standaardtherapie, welke bestaat uit hoge dosis chemotherapie. Onderzoek naar alternatieve therapieën waar patiënten met deze mutatie baat bij kunnen hebben is daarom van groot belang. In **hoofdstuk 4** hebben we het gebruik van hypomethylerende middelen (HMAs) onderzocht in een cohort van 47 AML patiënten. Beenmergmonsters werden beoordeeld op expressie van het p53-eiwit, omdat zeer hoge expressie vaak indicatief is voor een defect in het *TP53* gen. Patiënten met p53-overexpressie hadden een kortere totale overleving in vergelijking met patiënten met een normale p53 expressie. De responspercentages na behandeling met HMAs waren echter niet verschillend tussen beide groepen. Ook werden

er geen verschillen waargenomen in de tijd tot respons en de duur van de respons. Het verdwijnen van cellen met hoge p53-expressie wanneer complete remissie werd bereikt, geeft aan dat deze cellen gericht kunnen worden aangepakt met behulp van HMA's. De resultaten die worden beschreven in hoofdstuk 4 suggereren dat MN patiënten met een *TP53*-mutatie baat kunnen hebben bij behandeling met HMAs.

Lange tijd werd gedacht dat erfelijke aanleg voor MN's een ongewoon verschijnsel was en dat deze zeldzame gevallen zich alleen presenteerden op kinderleeftijd. De familiale aggregatie van MN's bij volwassenen werd ook sporadisch waargenomen, echter de technieken om de moleculaire basis van deze genetische predispositie te onderzoeken ontbraken. In de afgelopen jaren heeft de beschikbaarheid van nieuwe sequencing technieken ervoor gezorgd dat er steeds meer erfelijke kiemlijn mutaties zijn ontdekt die predisponeren voor de ontwikkeling van MN's. In **hoofdstuk 5** beschrijven we twee familiegeschiedenissen waarin meerdere patiënten op volwassen leeftijd werden gediagnosticeerd met AML of MDS. In hoofdstuk 5I beschrijven we over twee broers die zich presenteerden met een MN op respectievelijk 62- en 68-jarige leeftijd; leeftijden waarop ook sporadische MN's vaak worden gediagnosticeerd. WES onthulde de aanwezigheid van een kiembaanmutatie in de RNA-helicase *DDX41*. Eén patiënt ontwikkelde een donor cel leukemie (DCL) na allogene SCT met de cellen van zijn asymptomatische broer; dit is het eerste gerapporteerde geval van een DCL in de context van een kiemlijn *DDX41*-mutatie. Hoofdstuk 5II beschrijft drie patiënten uit één familie die zich presenteerden met een MN op volwassen leeftijd. WES toonde aan dat er sprake was van een kiembaanmutatie in een Fanconi-anemie gen bij deze

patiënten. De aanwezigheid van deze defecten komt normaal gesproken op kinderleeftijd tot uiting in de vorm van onder meer dysmorphieën, beenmergfalen en de ontwikkeling van kwaadaardige ziekten. In beide onderzoeken werd aanvullende sequencing van een panel genen welke vaak gemuteerd zijn in sporadische MN's verricht. Er werden enkele aanvullende mutaties gedetecteerd, zij het alleen laagfrequent. Deze resultaten geven aan dat deze mutaties geen deel uitmaakten van de belangrijkste leukemische kloon, maar waarschijnlijk subklonale hematopoëse vertegenwoordigen. De bevindingen uit hoofdstuk 5 onderstrepen de noodzaak om de aanwezigheid van genetische aanleg in volwassen MN patiënten te overwegen, ook wanneer er geen sprake is van prodromale verschijnselen. De herkenning van MN's met een erfelijke achtergrond kan grote gevolgen hebben voor het medisch beleid dat gevoerd moet worden, zoals voor donorselectie en de toepassing van aangepaste therapieën.

Voordat cellen met genetische mutaties in staat zijn te transformeren richting een MN moet waarschijnlijk een verstoring optreden in transcriptionele netwerken die betrokken zijn bij stamcelbehoud en -differentiatie. In een deel van de AML patiënten komt de transcriptiemodulator *CITED2* verhoogd tot expressie, een observatie die duidt op een mogelijke rol voor dit eiwit in de pathogenese van deze ziekte. In **hoofdstuk 6** werd de situatie van verhoogde *CITED2* expressie nagebootst door *CITED2* tot overexpressie te brengen middels een lentiviraal construct in *CD34*⁺-hematopoëtische stam- en voorlopercellen (HSPC's) afkomstig uit navelstrengbloed. Overexpressie van *CITED2* resulteerde in een toename van expansie van HSPC's in vitro en verbeterde de innesteling van deze cellen in vivo in een deel van

de muizen. Beide bevindingen zijn suggestief voor een beter behoud van primitieve hematopoietische cellen, wat mogelijk verklaard kan worden door de verminderde apoptose (georganiseerde celdood) en verhoogde quiescence ('rustende' staat van de cel) die werd waargenomen in HSPCs met CITED2-overexpressie. Verder werd een nieuwe interactie tussen CITED2 en PU.1 beschreven. PU.1 is een hematopoietische transcriptiefactor die vaak geïnactiveerd wordt gevonden in AML. Verlies van normale CITED2 functie middels RNA-interferentie (RNAi) resulteerde in een deel van de AML monsters in het verlies van het potentieel om *in vitro* te groeien. **Hoofdstuk 7** richt zich op mechanismen die ten grondslag liggen aan de impact die het verlies van CITED2-expressie heeft op cellulaire overleving. RNAi-geïnduceerd verlies van CITED2 resulteerde in p53-gemedieerde apoptose. Er kon worden aangetoond dat dit mechanisme niet direct wordt gereguleerd via p300/CBP, maar dat de AKT-siginaaltransductieroute hiervoor van belang bleek. De resultaten van hoofdstuk 6 en 7 samen laten zien dat CITED2 essentieel is voor de overleving van leukemische cellen.

In de afgelopen jaren is onze kennis met betrekking tot de oorsprong, ontwikkeling en instandhouding van MN's sterk verbeterd. Populatie- en patiëntenstudies hebben inzicht gegeven in de verschillende genetische

defecten die ten grondslag liggen aan MN's, terwijl fundamenteel onderzoek de mechanismen achter deze individuele mutaties blijft ontdekken. Deze toenemende hoeveelheid kennis heeft echter nog niet zijn weg gevonden naar de dagelijkse patiëntenzorg in de kliniek. Veel vragen zijn momenteel nog onbeantwoord; wat zijn de effecten van individuele genetische defecten op bijvoorbeeld ziekte-initiatie, ziekteontwikkeling, ziekte-agressiviteit, respons op therapie en de ontwikkeling van resistentie? Een complicerende factor hierin is dat genetische defecten vaak in combinaties voorkomen in één patiënt; wat zijn de consequenties van deze combinaties? De bevinding dat de aanwezigheid van genetische mutaties niet automatisch resulteert in de ontwikkeling van MN's benadrukt de noodzaak om dit proces met een brede blik te bestuderen. Voor de identificatie van de nog onbekende mechanismen die een rol spelen bij de ontwikkeling van leukemie, zal het bestuderen van MN's op een integratieve manier benaderd moeten worden waarbij de focus ook op andere niveaus dan alleen het DNA moet liggen. Een intensieve samenwerking tussen klinisch en fundamenteel onderzoek is hiervoor onontbeerlijk. Uiteindelijk is het doel, maar ook de grote uitdaging, voor de komende jaren om alle nieuwe kennis bruikbaar te maken voor de klinische doeleinden, met een verbetering van de patiëntenzorg als resultaat.

Dankwoord

Zie hier mijn proefschrift; het fysieke resultaat, maar voor mij zeker niet de grootste verdienste, van mijn inspanningen in de afgelopen jaren. Talloze mensen hebben ervoor gezorgd dat mijn PhD tijd een leerzame, maar bovenal onvergetelijk leuke ervaring is geworden. Een aantal van hen wil ik hier in het bijzonder benoemen.

Allereerst dank aan alle patiënten die materiaal hebben gedoneerd ten bate van wetenschappelijk onderzoek, zonder hen was de uitvoering van mijn onderzoek niet mogelijk geweest.

Mijn promotor Prof. Dr. E. Vellenga, beste Edo, bedankt voor de goede begeleiding en het vertrouwen dat ik heb gekregen in de afgelopen jaren. Ik waardeer de vrijheid die ik heb gekregen om projecten op mijn eigen manier in te richten. Uw uitgebreide kennis en netwerk schiepen voor mij de voorwaarden om de verschillende projecten succesvol te kunnen uitvoeren. Onze samenwerking heeft hierdoor zowel efficiënt als heel plezierig kunnen verlopen, veel dank hiervoor.

Copromotor Dr. H. Schepers, beste Hein, jij hebt mij als student enthousiast weten te maken voor het onderzoek in het lab. Bedankt voor de kans die ik heb gekregen om een MD/PhD traject te gaan doen, zonder jou was dit proefschrift er niet geweest.

De leden van de leescommissie, Prof. Dr. M.A.T.M. van Vugt, Prof. Dr. G. de Haan en Prof. Dr. M.H.G.P Raaijmakers wil ik bedanken voor hun tijd om mijn proefschrift te beoordelen.

Prof. Dr. J.H. Jansen, beste Joop, vanaf het begin was jij betrokken bij mijn onderzoek, bedankt voor de kritische blik en fijne en succesvolle samenwerking. Leonie en Thessa, ik had me geen betere samenwerkingspartners kunnen wensen. Met elkaar hebben we mooie dingen kunnen neerzetten, maar bovenal bedankt voor alle gezelligheid. Ook dank aan alle andere medewerkers van de afdeling laboratoriumgeneeskunde van het Radboud UMC voor jullie gastvrijheid.

Prof. Dr. J.J. Schuringa, beste JJ, bedankt voor alle input tijdens werkbesprekingen en Prof. Dr. G. Huls, beste Gerwin, dank voor de interesse in mijn onderzoek en de kansen die ik heb gekregen. Voor beide geldt dat ik jullie aanstekelijke enthousiasme erg waardeer.

Alle co-auteurs wil ik bedanken voor hun bijdrage aan de diverse projecten.

Staf Hematologie, arts-assistenten, verpleegkundigen en afdelingsassistenten werkzaam op de afdelingen D1 en E2, dank voor de begeleiding en de fijne samenwerking tijdens mijn kennismaking met de hematologie in de klinische praktijk. Medewerkers van het secretariaat hematologie, bedankt voor jullie hulp de afgelopen jaren.

Dear colleagues, you have made my time in- and outside the experimental hematology lab very valuable. Together we could celebrate successes and put (sometimes not

so) occasional letdowns into perspective. Just thinking about the conferences, lab days, volleyball tournaments, camping trip, India trip, afterwork borrels and parties for all kinds of occasions makes me smile again.

A special thanks to Aida and Kathi, I am very grateful with the two of you as my paranymphs. We started at around the same time in the lab and since then we have been like three peas in a pod. Thank you for the Sunday afternoon coffee sessions, the positivity and the laughs we had together, but especially for being such good and caring friends to me. I am looking forward to see both of your defenses!

My office mates: Maurien, bedankt voor alle goede raad, Mylène, bedankt voor de leuke samenwerking in mijn reservetijd, Alan, Ayşegül, Sonya, Martijn, thank you for the laughs and our conversations about literally everything. Please don't forget the fine-pot that is awaiting to be spent well some evening.

Marjan, Bart-Jan en Fiona, ik heb regelmatig een beroep op jullie moeten doen voor hand-en-span diensten, bedankt voor alle hulp en voor jullie fijne aanwezigheid. Harm-Jan, Annet, Robin, Vincent, Carolien bedankt dat ik gebruik mocht maken van jullie uitgebreide ervaring op allerlei vlakken. Mede PhD-ers van het eerste uur Bauke, Hendrik en Henny, dank voor de leuke tijd en veel succes met alle nieuwe uitdagingen die op jullie pad gaan komen. Roos, Shanna, Isabel and Isabelle, thanks for the gezelligheid during the last phase of my PhD.

Past lab members: Patrick, Susan, Jeanet, Jenny, Mattieu, Pallavi, Martha, Antonella, Janine and students, thank you for your contribution to the good atmosphere, it was fun working together with you. Marco, thank you for your enthusiasm. Lieke, bedankt voor de leuke samenwerking zowel in het lab als de kliniek.

Ook collega's van de immunohematologie, kinderoncologie, medische oncologie, gynaecologische oncologie en de flow cytometrie faciliteit wil ik bedanken voor alle input en de gezelligheid op en buiten de werkvloer.

Vrienden en vriendinnen uit Groningen en daarbuiten, bedankt voor jullie steun op allerlei fronten en ook voor de nodige ontspanning.

Leave famylje, tank foar alle stipe yn saken dy't echt belangryk binne. Heit en mem, tank dat ik de kâns krigen haw om te dwaan wat ik aardich fyn en dat jimme der altyd foar ús binne. Anneke, Afke en Klaske, ik bin seinige mei trije sokke moaie leave minsken om my hinne. Tank foar alle gekte, dit boekje is foar jimme.

En natuurlijk Pepijn, met jou samen is alles zo veel leuker! Hoe speciaal is het dat we dit hele traject samen hebben mogen doorlopen. Jij bent mijn maatje, bedankt voor alles.

Gerbrig

A

Over de auteur

Gerbrig Berger werd geboren op 5 juni 1989 te Heerenveen. Na afronding van het VWO startte zij in 2008 met de bacheloropleiding Life, Science and Technology (LS&T) aan de Rijksuniversiteit te Groningen. Als hoofdrichting volgde zij de major Biomedische wetenschappen en de vrije ruimte werd besteed aan een minor Human Physiology aan de University of Aberdeen te Schotland. Het bachelordiploma LS&T behaalde ze met het predikaat *cum laude*, waarna zij werd geselecteerd voor het zij-instroomtraject Geneeskunde. In het opvolgende jaar behaalde ze het bachelordiploma Geneeskunde via dit programma. Als onderdeel van de masteropleiding Geneeskunde liep zij coschappen in het Universitair Medisch Centrum Groningen, Refaja ziekenhuis te Stadskanaal, Antonius Ziekenhuis te Sneek, Medisch Centrum Leeuwarden en het Martiniziekenhuis te Groningen. In januari 2018 behaalde Gerbrig haar artsenbul. Haar wetenschappelijke stage in 2012 op de afdeling Experimentele Hematologie resulteerde in de toekenning van een MD/PhD beurs door de Junior Scientific Masterclass om wetenschappelijk onderzoek naast de reguliere masteropleiding Geneeskunde te kunnen voortzetten. De resultaten van het promotieonderzoek onder leiding van Prof. Dr. E. Vellenga en dr. H. Schepers staan beschreven in dit proefschrift. Binnenkort zal zij starten met de opleiding tot arts-microbioloog in het UMCG.

Publicaties

G Berger*, LI Kroeze*, TN Koorenhof-Scheele, *et al.* Early detection and evolution of pre-leukemic clones in therapy-related myeloid neoplasms following autologous SCT. *Blood*, 2018

G Berger, E van den Berg, B Sikkema-Raddatz, *et al.* Re-emergence of acute myeloid leukemia in donor cells following allogeneic transplantation in a family with a germline DDX41 mutation. *Leukemia*, 2017

G Berger*, K Mattes*, M Geugien, *et al.* CITED2 affects leukemic cell survival by interfering with p53 activation. *Cell Death & Disease*, 2017

G Berger, E van den Berg E, S Smetsers, *et al.* Fanconi Anemia presenting as AML/MDS in adulthood: a family report on co-occurring FANCC and CHEK2 mutation. *British Journal of Haematology*, 2019

LH van der Helm, **G Berger**, A Diepstra, *et al.* Overexpression of TP53 is associated with poor survival, but not with reduced response to hypomethylating agents in older patients with acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2017

PM Korthuis, **G Berger**, B Bakker, *et al.* CITED2-mediated human hematopoietic stem cell maintenance is critical for acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2015

G Berger, M Gerritsen, T Koorenhof-Scheele, *et al.* Ringsideroblasts in acute myeloid leukemia are associated with adverse risk and result from an aberrant heme-metabolism gene program. *Submitted*

* Gedeeld auteurschap

