

University of Groningen

The aberrant transcriptional program of myeloid malignancies with poor prognosis

Gerritsen, Myléne

DOI:
[10.33612/diss.113503008](https://doi.org/10.33612/diss.113503008)

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:
2020

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

Citation for published version (APA):

Gerritsen, M. (2020). *The aberrant transcriptional program of myeloid malignancies with poor prognosis: the effects of RUNX1 and TP53 mutations in AML*. Rijksuniversiteit Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.113503008>

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.

A



Appendices

- Nederlandse samenvatting voor “niet ingewijden”
- Dankwoord
- List of publications

NEDERLANDSE SAMENVATTING VOOR "NIET INGEWIJDEN"

Zonder bloed in je lichaam kun je niet leven. Bloed is het enige orgaan dat zich vrij door het lichaam kan bewegen; een volwassen persoon heeft ongeveer 4-6 liter bloed. Bloed is een mix van plasma met daarin eiwitten, vetten, hormonen en andere voedingsstoffen, maar bevat ook bloedcellen. Er zijn meerdere soorten bloedcellen. De bekendste zijn rode bloedcellen, die belangrijk zijn bij het transporteren van zuurstof van de longen naar alle andere cellen van je lichaam en ze verplaatsen ook weer het koolzuurgas naar buiten. Daarnaast zitten er in je bloed ook bloedplaatjes, die belangrijk zijn bij de stolling van je bloed bij wondjes, en witte bloedcellen. Witte bloedcellen, ook wel leukocyten genoemd, zijn betrokken bij het afweersysteem van ons lichaam. Per minuut worden er ongeveer 350 miljoen bloedcellen aangemaakt! De aanmaak van al deze cellen is een ingewikkeld proces dat heel precies gereguleerd moet worden, en het aanmaaksysteem moet in staat zijn om bij elke aanslag op het lichaam snel te kunnen reageren. Zo moet er bij een bloeding snel nieuwe rode bloedcellen aangemaakt kunnen worden en bij een infectie moeten er snel witte cellen aanwezig zijn voor de afweer. Al deze verschillende soorten bloedcellen ontstaan door rijping en deling van voorlopercellen, genaamd bloedstamcellen, in bloedfabriekjes in onze botten, genaamd het beenmerg. Tijdens de vorming van bloedcellen en bij zoveel celdelingen in de groei van beenmerg- en lymfkliercellen gaat er regelmatig wat mis.

Soms ontstaan er, bijvoorbeeld door celdelingen, fouten in specifieke delen van het DNA van een cel; daar liggen onze erfelijke eigenschappen verborgen, in zogenaamde genen (kleine stukjes DNA). Genen in het DNA (+/- 30.000 in de mens) bevatten de code voor de opbouw van eiwitten, de werkpaarden van een cel die specifieke functies uitoefenen. Als er een fout in een gen zit wat belangrijk is voor deze cel dan kan dat worden vertaald naar een foutief eiwit die daardoor een andere functie krijgt. In veel gevallen is de invloed van zo'n fout maar minimaal, maar zodra er meerdere fouten zich opstapelen in een cel kan het risico op een kwaadaardige ziekte, bijvoorbeeld leukemie (bloedkanker) ontstaan. Gelukkig is het lichaam meestal in staat om de foute cellen uit te schakelen, maar soms winnen de kwaadaardige cellen en wordt een persoon ziek.

In onderzoek naar leukemie zijn er al veel verschillende soorten fouten gevonden waarvan gedacht wordt dat deze van belang zijn, maar hoe deze fouten precies invloed hebben op het cel gedrag is niet geheel bekend. Een eiwit waarbij regelmatig een fout wordt gevonden in patiënten met leukemie is Runx1. Dit eiwit is erg belangrijk in de vorming van zowel bloedplaatjes, rode bloedcellen en witte bloedcellen; een fout hierin kan dus gelijk van grote invloed zijn. Het Runx1 eiwit zelf is een zogenaamde transcriptie factor; dit betekent dat deze medebepalend is welke eiwitten er in de cel aangemaakt worden. Ze zijn namelijk betrokken bij het aflezen van ons genetisch materiaal. Ook is bekend dat mensen die een aangeboren fout hebben in het Runx1 eiwit meer kans hebben op het ontwikkelen van een kwaadaardige bloedziekte. Het is ook mogelijk dat er een verstoring optreedt als het Runx1 eiwit zich afwijkend bindt aan een ander eiwit, genaamd



Eto, wat ook voorkomt bij een bepaalde groep patiënten met bloedkanker of leukemie. Hoe dit precies vertaald wordt is nog onbekend en dit is dan ook het onderwerp geweest van onderzoek in de afgelopen jaren. In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift hebben wij onderzoek gedaan wat de invloed is op de uitrijping van bloedstamcellen als er een foutief Runx1 eiwit aanwezig is. We observeerden een verstoorde uitrijping in de rode- en witte bloedcelformatie. Door in de cel te vergelijken welke stukken DNA (genen) er meer of minder worden vertaald in de cel in aanwezigheid van het foutieve Runx1 eiwit konden we bepalen wat de exacte effecten zijn in de cel. We vonden dat er een verminderde aansturing was van genen die betrokken waren bij de uitrijping van voornamelijk witte bloedcellen en een vermeerderde aansturing van genen die vaak gevonden worden in bloedstamcellen. Als we onze data vergelijken met cellen waarin het Runx1 eiwit is gefuseerd aan het Eto eiwit, dan zien we dat de aansturing van genen tussen beide celtypen sterk verschilt. Deze verschillen zijn mogelijk van invloed hoe de patiënten reageren op hun behandeling. Door het in kaart brengen van deze verschillen kunnen we veel leren over het verschillende verloop van beide ziekten.

In **hoofdstuk 3** hebben we specifiek gekeken naar één eiwit dat versterkt wordt aangemaakt als gevolg van een fout in het Runx1 eiwit, een eiwit genaamd Tcf4. Van Tcf4 is al bekend dat het in sommige patiënten met leukemie vaker wordt aangemaakt en dat dit een ongunstig voorteken is op het verloop van de ziekte. Wanneer wij het gen dat verantwoordelijk is voor het foutieve Runx1-eiwit in de cel zetten, vinden we dat er meer cellen zijn die kunnen functioneren als een bloedstamcel en dat deze cellen problemen hebben met de uitrijping. Zodra we ervoor zorgen dat er minder Tcf4 aanwezig is in de cel, dan zien we deze effecten verdwijnen. Deze bevindingen in het laboratorium worden ook teruggevonden bij leukemie patiënten die behandeld zijn met celdodende middelen. De aanwezigheid van veel Tcf4 in de kwaadaardige cellen is een ongunstige voorspellende factor voor het verloop van de ziekte en deze lijkt belangrijker te zijn dan een fout in het Runx1 eiwit. Opmerkelijk is dat patiënten die een Runx1 eiwit hebben dat gefuseerd is aan Eto juist een veel lagere Tcf4 spiegel hebben en daardoor mogelijk een betere kans hebben om te overleven. We denken daarom dat Tcf4 een belangrijk eiwit is in de werking van foutief Runx1.

Een ander eiwit waarin vaak een fout wordt gevonden in veel verschillende kankers, maar ook in leukemie is het p53 eiwit. In een normale cel wordt p53 snel afgebroken omdat het betrokken is bij de celdood van de cellen, maar wanneer er fouten ontstaan in het p53, bijvoorbeeld door een langdurige behandeling met celdodende medicijnen of tijdens de celdeling, blijft het p53-eiwit langer geactiveerd en verliest het zijn functie bij celdood. Hierdoor kunnen verkeerde cellen en uiteindelijk kanker ontstaan doordat p53 niet meer werkt zoals het moet, en kan de cel de ontstane fouten niet meer controleren waardoor er een grotere kans ontstaat op het ontstaan van een kwaadaardige tumor. In **hoofdstuk 4** hebben wij gekeken naar hoe een foutief p53 eiwit en de volledige afwezigheid van dit eiwit invloed heeft op de uitrijping van bloedstamcellen en hoe dit de aanmaak van andere eiwitten beïnvloedt in de cel. In de aanwezigheid van een foutief p53, maar ook bij de volledige afwezigheid van p53, worden meer onrijpe cellen gevonden die

in de tijd wel konden uitrijpen tot effectieve witte bloedcellen. Daarnaast vonden we ook dat juist foutief p53 eiwit invloed heeft op de uitrijping van rode bloedcellen. Als we echter leukemie cellen van patiënten onderzoeken waarbij een foutief p53 aanwezig is, dan lijken de effecten op de aansturing van specifieke genen maar heel gering. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat andere fouten in de leukemie cellen een veel dominanter effect hebben. Wel wordt er een verschil in de aansturing van genen gevonden die belangrijk zijn voor de vorming van rode bloedcellen.

In **hoofdstuk 5** hebben we gekeken naar de aanwezigheid van rode bloed voorloper cellen, de zogenaamde normoblasten met een te veel aan ijzer in de mitochondrion die we ring sideroblasten noemen. Dit is een fenomeen dat kan ontstaan door bijvoorbeeld te veel gebruik van alcohol of door gebruik van bepaalde medicijnen, maar het kan ook ontstaan door meerdere aangeboren fouten in verschillende genen in de cel die leiden tot de aanwezigheid van foutieve eiwitten. Ring sideroblasten zijn een kenmerk die regelmatig wordt waargenomen in het beenmerg van patiënten met myelodysplastisch syndroom (MDS). MDS is bloedziekte waarbij er problemen zijn met de uitrijping van bloedvormende cellen waardoor patiënten vaak bloedarmoede hebben omdat ze te weinig rode bloedcellen aanmaken. Deze patiënten worden behandeld met bloedtransfusies en met medicijnen die de rode bloedcel vorming stimuleren waaronder erythropoëtine. In bijna alle patiënten met MDS en ring sideroblasten is er een fout in het SF3B1-eiwit aanwezig. In dit onderzoek hebben we gekeken naar het voorkomen van ring sideroblasten bij patiënten met acute myeloïde leukemie (AML) waarbij we eigenlijk nooit een mutatie vinden in het SF3B1-gen. Bij meerdere patiënten hebben we gekeken naar de verschillende soorten fouten die we in kwaadaardige cellen konden vinden. Ring sideroblasten komt bij 20% van de AML patiënten voor maar een fout in èèn specifiek gen konden we niet aantonen. We vonden niet één gen dat in alle patiënten foutief was, maar we vonden wel vele verschillende fouten en met name die een ongunstige voorspeller zijn voor het verloop van de ziekte. Het meest frequent werden fouten in het p53-gen gevonden, maar bijvoorbeeld ook in het Runx1-gen. Als we kijken naar de aansturing van genen bij leukemie patiënten met en zonder deze ring sideroblasten, dan zien we dat er een verschil is in genen die betrokken zijn bij de aanmaak van rode bloedcellen en bloedplaatjes. Echter aanvullend onderzoek is nog vereist om aan te tonen hoe dit verschil in de aanwezigheid van deze genen belangrijk is voor de vorming van ring sideroblasten.

We hebben ons in dit onderzoek gericht op het ontrafelen van fouten in genen die effecten hebben op de samenstelling van eiwitten in bloedvormende cellen waardoor functies van cellen zich wijzigen maar die ook mede voorspellers zijn voor het verloop van de ziekte. Deze kennis is een belangrijk uitgangspunt voor gerichte therapie bij leukemie patiënten die specifiek deze foutieve eiwitten kunnen hebben. Uiteindelijk is het doel en ook de uitdaging voor de komende jaren om een manier te vinden om deze kennis in de kliniek te implementeren, met daarbij een verbetering van de patiëntenzorg als resultaat.



DANKWOORD

Allereerst wil ik alle patiënten en donoren die materiaal hebben gedoneerd ten bate van wetenschappelijk onderzoek bedanken voor hun bijdrage. Zonder hen zou dit proefschrift niet tot stand gekomen zijn.

Beste **Edo**, nu is toch eindelijk, na ongeveer 6,5 jaar, het punt gekomen waarop ik eindelijk mag promoveren! Ondanks dat we, vooral in het begin, nogal eens botsten door onze verschillende persoonlijkheden, zijn we toch tot een symbiose gekomen omdat we allebei het zelfde doel voor ogen hadden; goed onderzoek doen. Daarbij kreeg ik van u het vertrouwen en de vrijheid om zelf vorm te geven aan de verschillende projecten en stimuleerde u het aangaan van samenwerkingen. Ik heb daar ontzettend veel van geleerd en hoop er een betere onderzoeker door te zijn geworden. Bedankt voor alles! Nu is het klaar, en mag u gaan genieten van uw welverdiende pensioen.

JJ, bedankt voor jouw enthousiasme en input tijdens de meetings. Jij herinnerde mij er altijd aan hoe mooi en leuk het onderzoek kan zijn als ik dat soms even vergeten was, waardoor ik weer met een frisse blik verder kon. En natuurlijk bedankt voor het verbinden van mij en Florentien waar uiteindelijk een heel nieuw project uitgerold is!

Beste **Joost**, jouw bijdrage aan dit proefschrift is van onschatbare geweest! Je gastvrijheid tijdens de vele weken die ik in Nijmegen heb doorgebracht; het beantwoorden van alle e-mailtjes die je van mij kreeg met alle (domme) vragen; alle analyses die je hebt gedaan; alle stukken die je eindeloos hebt gecorrigeerd; alle discussies die we hebben gevoerd; en nog veel meer. Bedankt voor alles! Ik ben dan ook erg blij dat je ook nu weer betrokken bent bij mijn nieuwe project en ik hoop dat we nog vele mooie data mogen gaan delen.

Daarnaast wil ik graag alle leden van de leescommissie, prof. **Gerald de Haan**, prof. **Marcel van Vugt** en prof. **Henk Stunnenberg** bedanken voor het beoordelen van dit proefschrift.

Alle coauteurs; bedankt voor jullie bijdragen aan alle stukken uit dit proefschrift! **Guoqiang**, your contribution to my thesis has really made a difference, you are such a talented bioinformatician. Thank you for the good cooperation! I wish you all the luck in China. **Esther**, het iPSC deel heeft een goede bijdrage gehad in het runx1 stuk EN is een inspiratie geweest voor allerlei nieuwe experimenten! Bedankt voor de fijne samenwerking! **Gerwin**, je was altijd geïnteresseerd in hoe het nu stond met het TCF4 project ondanks dat je ontzettend druk bent. Dankjewel voor je input en vertrouwen! **Eva**, bedankt voor alle hulp in Nijmegen. Voor het runnen van de bioanalyzer, het laden van de sequencer, jij regelde het allemaal!

Joop en **Florentien**; we hebben een hele fijne samenwerking gehad en ik ben blij dat we deze kunnen voorzetten! Bedankt voor jullie vertrouwen in mij en ik hoop dat we uiteindelijk antwoord kunnen geven op de vraag wat nou precies het belangrijkste eiwit van de wereld is ;).



Mijn paranimfen: **Lieveke**, ik ben zo ontzettend blij met jouw vriendschap! Mede dankzij jouw luisterende oor en onze gesprekken tot diep in de nacht (meestal gecombineerd met veeel wijn ;) heb jij mij vele nieuwe inzichten gegeven en ben ik een beter mens geworden. In goede en slechte tijden was jij er voor mij. Ik hou van je! **Aysegül**, I am thankful to have you as such a good friend! Who would have thought 3 years ago ;). I enjoy our tea-sessions, gossip-moments and dancing-evenings and I hope to enjoy them with you for the next 50 years or so. Thank you for being in my life! Seni seviyorum!

My thanks go to my all **my colleagues from the Experimental Hematology lab** for their openness and willingness to help whenever and wherever needed and to share knowledge! And also for creating a nice working environment; I have enjoyed all the parties, friday(or any other day)-afternoon-drinks, labdays etc. with you all! In het bijzonder wil ik bedanken **Annet, Bart-jan, Fiona, Marjan, Maurien, Robin en Vincent**; jullie zijn het hart en ziel van het lab! Naast dat jullie alles draaiende houden, met alle bestellingen en het invriezen van al het patiënten-materiaal naast jullie eigen projecten, stonden jullie altijd klaar om al mijn (domme) vragen te beantwoorden of mij op weg te helpen, of bij te staan, met experimenten. Daarnaast waren jullie altijd in voor een leuk feestje en konden we lekker dom lullen op z'n tijd. Maar ook kon ik ook altijd bij jullie terecht voor hulp bij mijn verhuizingen ;);wat goede raad, een opbeurend praatje of gewoon een knuffel als ik weer eens met mijn ziel onder de arm liep. Jullie maakten dit lab en Groningen tot mijn thuis. Dank jullie wel!! **All my former office buddies**: thanks all for the good times we had; all the office drinks, chats, laughs and sharing of the latest gossip. But also for taking care of me when I needed it. **Susie**, our p53 paper has made it! I am glad we have become friends, I can't wait to come and visit you in Switzerland in the near future. **Gerbrig**, we hadden een fijne samenwerking, ik ben blij dat er een leuke publicatie uit voort gekomen is. **Emmanuel**, thanks for your help with moving! I think you are a very nice addition to the lab, just as crazy as the rest of the bunch. **Maia**, I miss you! Always so nice to catch up; hope you are doing well in England.

Mannen van de flowcytometrie; **Johan, Geert, Theo, Wayel** en natuurlijk ook **Henk en Roelof-Jan**; Bedankt. Voor alle uren dat jullie voor mij gesorteerd hebben en ook voor alle uren dat jullie besteed hebben om de Astrios te fixen als ik weer eens op 100 nozzle wilde sorteren ;). Maar het allerbelangrijkste: bedankt voor jullie gezelligheid en het heerlijke slappe gelul waarvoor ik altijd bij jullie terecht kon! **Arthur**, tu és a única pessoa que realmente entende a minha visão estranha da vida e do mundo, e espero que possamos continuar a partilhar regularmente este nosso gozo com tudo e todos por muito tempo. Obrigado por tornares o meu último ano em Groningen muito mais agradável!

Alle leden van de research **MH** en **CTI**; bedankt voor het warme welkom in Nijmegen, en sterkte met mij de komende jaren =) .

Lieve vrienden uit Nijmegen en beyond inmiddels, ook al waren jullie niet direct betrokken bij het bij elkaar pipetteren van dit proefschrift, jullie hebben toch wel degelijk een bijzondere bijdrage

geleverd aan het tot stand komen van dit werk. **Astrid B, Astrid J, en Stefhanie** en **alle aanhang!** Jullie hebben mijn beste EN slechtste momenten meegemaakt, en jullie zijn er nogsteeds! Ik kan me geen betere vrienden bedenken! **Nick** en **Gwenda**, ik vind het altijd zo fijn om weer met jullie bij te kletsen en met James te spelen! Het voelt altijd als thuis, hoever het ook is. **Guus**, bro from another ho, het is altijd weer fijn om gezellig te borrelen, ik ga (bijna) altijd met buikpijn van het lachen weer naar huis. Ik hoop op nog veel borrels met **Monique** en **Sander!** **Barbera** en **Erwin**, ik vind het altijd fijn om bij jullie langs te komen. Heerlijk om met z'n allen met een wijntje bij het eten de laatste internet-roddels door te nemen. Ik ben jullie **allen** dankbaar voor al het gelach, slap gelul, geknuffel, drankjes, etentjes, feestjes, slaappartijtjes, gezelligheid. Maar ook bedankt voor jullie steun, motivatie, luisterende oren, nachtelijke gesprekken en liefde. Ik hou van jullie!



List of Publications

- **Gerritsen M**, Hilgendorf S, Yi G, Wierenga ATJ, Schuringa JJ, Martens J, Vellenga E. Mutant p53 increases stem-cell frequency but is associated with reduced binding to classical TP53 binding sites in primary AMLs and cell lines. *Submitted*.
- In 't Hout FEM, **Gerritsen M**, Bullinger L, van der Reijden BA, Huls G, Vellenga E, Jansen JH. Transcription factor 4 (TCF4) expression predicts clinical outcome in RUNX1 mutated and translocated acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2019 Dec 18. [Epub ahead of print].
- Mattes K, **Gerritsen M**, Folkerts H, Geugien M, van den Heuvel FA, Flohr Svendsen A, Yi G, Martens JHA, Vellenga E. CD34+ acute myeloid leukemia cells with low levels of reactive oxygen species show increased expression of stemness-genes and can be targeted by the BCL2 inhibitor Venetoclax. *Haematologica*. 2019 Nov 14. [Epub ahead of print].
- Berger G, **Gerritsen M**, Yi G, Koorenhof-Scheele TN, Kroeze LI, Stevens-Kroef M, Yoshida K, Shiraishi Y, van den Berg E, Schepers H, Huls G, Mulder AB, Ogawa S, Martens JHA, Jansen JH, Vellenga E. Ring sideroblasts in AML are associated with adverse risk characteristics and have a distinct gene expression pattern. *Blood Adv*. 2019 Oct 22;3(20):3111-3122.
- **Gerritsen M**, Yi G, Tijchon E, Kuster J, Schuringa JJ, Martens JHA, Vellenga E. RUNX1 mutations enhance self-renewal and block granulocytic differentiation in human in vitro models and primary AMLs. *Blood Adv*. 2019 Feb 12;3(3):320-332.
- Tijchon E, van Emst L, Yuniati L, van Ingen Schenau D, **Gerritsen M**, van der Meer LT, Williams O, Hoogerbrugge PM, Scheijen B, van Leeuwen FN. Tumorsuppressor BTG1 limits activation of BCL6 expression downstream of ETV6-RUNX1. *Exp Hematol*. 2018 Apr;60:57-62.e3.

