

University of Groningen

A proteomic approach for leukemia epigenetics research

van Dijk, Anneke Dirkje

DOI:
[10.33612/diss.183763111](https://doi.org/10.33612/diss.183763111)

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:
2021

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

Citation for published version (APA):
van Dijk, A. D. (2021). *A proteomic approach for leukemia epigenetics research: target identification, prognostication and therapeutic guidance*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.183763111>

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.

CHAPTER 9

**DUTCH SUMMARY / NEDERLANDSE
SAMENVATTING**

Nederlandse samenvatting

Introductie

Alle rondcirculerende bloedcellen in het lichaam komen voort uit een multipotente hematopoïetische stamcel die zich in het beenmerg bevindt. Dit proces wordt de hematopoëse oftewel bloedaanmaak genoemd. De hematopoïetische stamcellen hebben de unieke eigenschap om zichzelf te hernieuwen of zich te differentiëren in een specifieke bloedcel. Dit betekent dat de formatie van de verschillende bloedcellen is georganiseerd als een cellulaire hiërarchie. In het algemeen zijn er twee grote soorten bloedlijnen te onderscheiden, de lymfoïde en de myeloïde lijn. Een verstoring in het uitrijpingsproces van de HSC tot specifieke bloedcel kan leiden tot leukemische transformatie wat zorgt voor een accumulatie van abnormale uitgerijpte bloedcellen in het beenmerg. Deze accumulatie zorgt vervolgens voor verdrukking van de normale hematopoëse en de vrijlating van leukemie cellen in het perifere bloedstelsel. Leukemie cellen zijn onderontwikkelde bloedcellen die niet in staat zijn om de specifieke taak van bloedcellen te vervullen. In de normale situatie hebben rode bloedcellen de functie om zuurstof van de longen naar de spieren en organen te brengen en koolstofdioxide af te voeren. De witte bloedcellen spelen een belangrijke rol in de afweer en bloedpaatjes zorgen voor het stoppen van bloedingen. De symptomen van de leukemie patiënt zijn terug te voeren op het ontbreken van de normale werking van deze cellen, namelijk vermoeidheid (tekort rode bloedcellen), terugkerende of niet genezende infecties (tekort witte bloedcellen) en bloeduitstortingen en blauwe plekken (tekort bloedplaatjes). De etiologie, pathofysiologie en uiteindelijke gedrag en karakter van de leukemie hangt af van het moment wanneer de differentie wordt verstoord (in de lymfoïde of myeloïde lijn). Daarnaast kan er sprake zijn van een acute of chronische aanvang van de ziekte.

De verstoringen in het bloedcel uitrijpingsproces die leiden tot leukemie zijn erg uitlopend. De bekendste zijn genetische afwijkingen zoals mutaties en chromosomale abnormaliteiten zoals translocaties. Aan de hand van de aan- of afwezigheid van deze factoren wordt een risicoschatting van de prognose gemaakt. Ondanks de prognostische waarde van deze moleculaire afwijkingen is er een disconnectie tussen het huidige classificeringssysteem en de therapeutische mogelijkheden, omdat de meeste chromosomale en genetische afwijkingen geen specifiek doelwit zijn voor de optionele therapie.

Een derde factor die bijdraagt aan de leukemie transformatie is epigenetische misregulatie. Epigenetica beïnvloedt de chromatine structuur en gen transcriptie zonder de genetische code te veranderen. Dit gebeurt door het DNA toegankelijk of minder toegankelijk te maken voor transcriptie. Deze toegankelijkheid van het DNA kan worden aangepast door verschillende epigenetische processen waarvan DNA methylatie en histone modificatie de bekendste zijn. De toevoeging van chemische methylatiegroepen aan het DNA ("DNA methylatie") voorkomt bijvoorbeeld dat het DNA kan worden afgelezen voor transcriptie, omdat er fysiek geen plek is voor transcriptiefactoren tussen de methylatiegroepen. Histone modificatie daarentegen gebruikt histone eiwitten om het DNA aan op te rollen. Strak opgerold DNA om deze histone eiwitten kan fysiek niet worden afgelezen wat de gen transcriptie beïnvloed. Chemische groepen aan de histone eiwitten bepalen of DNA wordt op- of uitgerold (dicht of open chromatine). Deze chemische groepen aan de histone eiwitten worden histone modificatie markeringen ("HMM") genoemd. Het toevoegen, verwijderen en lezen van deze HMM wordt gedaan door histone modifierende eiwitten ("HME"). Een misregulatie van dit proces door bijvoorbeeld een mutatie in een histone eiwit of abnormale expressie van een HME is gelinkt aan leukemie. Dit proefschrift focust op de klinische relevantie van de expressie van HMM en HME in verschillende subtypen leukemie.

Samenvatting

Leukemie is een complexe ziekte met een uiteenlopende biologie en prognose. Het is een ziekte die voorkomt op elke leeftijd en ondanks verbeteringen in chemotherapeutische en stamceltransplantatie behandelingen is leukemie een relatief veelvoorkomende oorzaak van kanker-gerelateerd overlijden. Het blijft dagelijks een uitdaging voor kinderoncologen en hematologen om de best mogelijke therapie te kiezen voor de individuele patiënt.

Afgelopen jaren is aangetoond dat naast chromosomale en genetische factoren ook epigenetische factoren een rol spelen in de ontwikkeling en het karakter van leukemie. Ondanks hun potentieel zijn deze echter nog niet geïntegreerd in de klinische setting. In dit proefschrift onderzochten we de klinische impact van verschillende HMM en HME in het bloed en beenmerg met behulp van de eiwitprofielen gemaakt door RPPA in acute myeloïde leukemie (AML), acute lymfatische leukemie (ALL) en chronische

lymfatische leukemie (CLL). Het doel van dit onderzoek is het identificeren van nieuwe epigenetica gerelateerde targets om vervolgens leukemische classificatie, prognosticatie en doelgerichte individuele therapie te verbeteren.

Na een algemene introductie in leukemie, epigenetica en eiwitprofieling (“proteomics”), bespreken we in **Hoofdstuk 2** voor het eerst dat HMM en HME expressie patronen vormen in AML en dat deze klinische impact hebben. Verschillende epigenetische eiwitten zijn in het verleden prognostisch gebleken, maar niet eerder werden meerdere eiwitten tegelijk gemeten in meerdere AML patiënten. In dit hoofdstuk analyseren we simultaan de expressie levels van 20 HME en HMM gerelativeerd aan hun expressie in normale CD34+ beenmerg cellen van gezonde donoren. We identificeerden vijf clusters welke we classificeerden als “normaal”, “hoog” of “laag” gebaseerd op de relatieve HMM en HME expressie. We observeerden dat patiënten die vielen in het cluster met “hoge” expressie kortere overleving hadden. Deze prognose was onafhankelijk van het cytogenetische profiel. Deze groep patiënten had ook significant een hoger percentage aan perifere en beenmerg leukemie blasten ten tijde van diagnose en meer resistentie tegen therapie. De geïdentificeerde clusters associeerden niet met leeftijd, gender of remissieduur. Patiënten met relatief hoge expressie van HME werden gekarakteriseerd door hoge expressie levels van BRD4, KDM1A, NCL, SIRT1 en hnRNPK. In dit manuscript discussiëren we hoe deze eiwitten mogelijk hebben bijgedragen aan de slechtere prognose. Deze data support voor de eerste keer dat RPPA-gebaseerde eiwitprofielen een potentiële tool is om nieuwe epigenetische targets te identificeren voor de behandeling van AML.

Epigenetische misregulatie van HMM is een bekende bijdragende factor aan de ontwikkeling van kanker. Meerdere onderzoeken hebben laten zien dat het verlies van H3K27me3 een negatieve invloed heeft op prognose. In **Hoofdstuk 3** onderzochten we de prognostische waarde van H3K27me3 en H3K4me2 en H3K4me3 in ALL en AML. Een groter verlies van H3K27me3 was net als in solide tumoren gerelateerd aan een slechtere prognose. Relatief lage H3K27me3 was een onafhankelijke voorspeller voor kortere overleving in zowel de gehele AML patiëntenpopulatie als in een subgroep patiënten met een mutatie in DNA methylatie gerelateerde genen. Gebaseerd op eiwit correlaties van H3K27me3 op de array observeerde we dat AML patiënten met lage H3K27me3 een anti-apoptose fenotype hadden. ALL patiënten met de Philadelphia cytogenetische afwijking (Ph+ ALL) met resistentie tegen tyrosine kinase inhibitors (TKI) hadden daarnaast significant lagere levels van de HMM ten tijde van diagnose vergeleken met de patiënten die goed reageerde op deze therapie. Opvallend was dat 2

van de 3 patiënten met resistentie tegen TKI een voorgeschiedenis hadden van roken, vergeleken met nul van de 8 patiënten met een goede respons na TKI. Het concept dat roken epigenetische processen beïnvloed is interessant om verder onderzocht te worden. In conclusie laat deze data zien dat eiwit profilering van HMM individuele patiënt uitkomsten beter kan helpen voorspellen in AML en Ph+ ALL. Ook zijn er enkele potentiële targets geïdentificeerd die mogelijk verder onderzocht kunnen worden in diagnostische en therapeutische zin.

In **Hoofdstuk 4** hebben we simultaan de expressie van epigenetica gerelateerde eiwitten gemeten in perifere bloed samples van 483 kinderen met AML met RPPA. Alle kinderen hebben behandeling gekregen volgens deelname aan de klinische studie uitgevoerd door de Children's Oncology Group (AAML1031) in de Verenigde Staten. Een deel van de patiënten die meedeed aan de klinische trial kreeg een extra middel toegevoegd aan de standaard chemotherapie, namelijk de proteasome inhibitor bortezomib (standaard+bortezomib). Echter is de studie vroegtijdig gestopt omdat er geen significante verbetering optrad na bortezomib toevoeging in de gehele patiëntenpopulatie. Ons doel was om subgroepen patiënten te identificeren die mogelijk wel baat hebben gehad van de bortezomib toevoeging.

Onze resultaten laten zien dat HME en HMM heterogeen tot expressie komen in AML samples van kinderen, net zoals we zagen in de volwassen populatie. Relatief hogere expressie van HME (hoge HME) was een onafhankelijke predictor voor kortere remissie duur en hogere kans op terugval na 3 jaar in de patiëntengroep die behandeld werd met standaard chemotherapie vergeleken met patiënten die lage expressie hadden van meerdere HME (lage HME). Dit resultaat was onafhankelijk van de HMM expressie. Ondanks dat we geen verschil vonden tussen de kansen van een terugval in standaard en standaard+bortezomib behandelde patiënten in zowel de lage als hoge HME groep, observeerden we dat 1 jaar na het einde van de inductie therapie de terugval kans 47% was met hoge HME na standaard therapie en 29% met hoge HME na standaard+bortezomib therapie. Bovendien was na 3 jaar de overlevingskans voor patiënten met hoge HME expressie die behandeld waren met standaard+bortezomib therapie significant verbeterd ten opzichte van de patiënten met hoge HME die geen bortezomib kregen. Vervolgens hebben we de chromatine toegankelijkheid geanalyseerd met ATAC-seq. Patiënten met hoge HME expressie hadden meer open chromatine rondom gen promotor regio's dan lage HME expressie patiënten. Daarnaast vonden we dat hoge HME levels correleerde met lagere FOXO3 eiwit expressie op de array. Patiënten met lagere FOXO3 hadden significant slechtere overleving na standaard

therapie, maar deze prognose werd verbeterd nadat bortezomib was toegevoegd. In dit hoofdstuk hebben we ook *in vitro* experimenten uitgevoerd om onze resultaten te valideren. We hebben een shRNA knockdown toegepast op FOXO3 in twee cellijnen. We demonstreren vervolgens dat FOXO3 knockdown cellen sneller groeien dan hun controles en dat FOXO3 knockdown cellen meer resistent zijn tegen doxorubicine en etoposide combinatie therapie dan de controle. In dit hoofdstuk bespreken we ook voor het eerst de FOXO3-vimentin correlatie in AML. Dus ondanks dat bortezomib toevoeging niet leidde tot verbetering in uitkomsten in de gehele AAML1031 populatie, laten wij met deze studie zien dat er een groep patiënten is dat potentieel wel profijt heeft van de bortezomib toevoeging op basis van hun HME profiel. We speculeren dat de toegenomen bortezomib sensitiviteit in verband staat met hoge HME expressie, meer open chromatine en hogere eiwitproductie.

In **Hoofdstuk 5** laten we de prognostische significantie zien van een ander eiwit dat we hebben geanalyseerd in patiënten uit de AAML1031 trial. We identificeerden dat lage phosphorylatie van Serine 536 van het RelA eiwit (RelA-pSer⁵³⁶) geassocieerd is met significant betere uitkomst na standaard chemotherapie plus bortezomib vergeleken met patiënten met relatief hoge RelA-pSer⁵³⁶ levels. RelA-pSer⁵³⁶ associeerde sterk met HSF1-pSer³²⁶ expressie levels. De prognostische waarde van HSF1-pSer³²⁶ is eerder aangetoond door Hoff et al. Als toevoeging beschrijven we in dit manuscript dat de combinatie van lage RelA-pSer⁵³⁶ en lage HSF1-pSer³²⁶ de prognose na standaard+bortezomib nog meer verbeterd dan wanneer een enkel eiwit wordt gemeten. Het meten van de expressie van deze twee eiwitten kan potentieel gebruikt worden als *a priori* identificatie van een groep AML patiënten (38% van de patiënten in deze studie) dat profijt heeft van aanvullende bortezomib therapie. HME status had geen invloed op de prognose wanneer beide phosphorylatie levels laag zijn, maar een kleine groep patiënten met lage RelA-pSer⁵³⁶ en hoge HSF1-pSer³²⁶ had significant betere overleving met bortezomib als HME hoog tot expressie kwamen vergeleken met lage HME.

In **Hoofdstuk 6** hebben we vier verschillende epigenetische clusters geïdentificeerd op basis van RPPA in een groot cohort van CLL patiënten ($n = 876$). Deze clusters associeerden met klinische variabelen waaronder leeftijd, cytogenetische afwijkingen [trisomie 12, del(17p)], immunoglobuline heavy-chain locus (IGHV) mutatie, ZAP-70 status en Binet en Rai classificaties. Ook was er een relatie tussen de clusters en patiënt uitkomsten, waaronder overleving en het therapievrije interval na diagnose. Het

epigenetische eiwit profiel is een onafhankelijke voorspeller voor overleving ondanks de aanwezigheid van andere klinische factoren. Onder de geanalyseerde epigenetische eiwitten waren met name EZH2, HDAC6 en verlies van H3K27me3 prognostisch. Vervolgens hebben we in kaart gebracht welke epigenetica eiwit profielen uitkomsten kunnen voorspellen voor de verschillende therapieën. De standaard therapie in CLL is aan het verschuiven door de komst van nieuwe inhibitors waaronder de Bruton's tyrosine kinase inhibitors (BTKi) en BCL-2 eiwit inhibitie door venetoclax. We hebben uitkomsten per therapie geanalyseerd en observeerden dat patiënten met een eiwitprofiel lijkend op kleincellig B-cell lymfomen maligniteiten een slechtere uitkomst hebben met elke moderne therapie en het meest baat hebben bij traditionele chemotherapie. CLL patiënten met lage HMM hadden slechtere prognose met chemotherapie, maar betere overleving na BTKi. Dit hoofdstuk laat zien dat een analyse van epigenetische eiwit biomarkers bruikbaar zijn voor prognosticatie en therapie selectie in CLL en daarmee complementair is aan genomische CLL classificaties.

Uiteindelijk sluiten we in **Hoofdstuk 7** af met een review waarin we zowel traditionele als de nieuwe therapeutische mogelijkheden bespreken in AML. Daarnaast beschrijven we het generale concept van eiwitprofilering en discussiëren we waarom en hoe deze techniek gebruikt kan worden in het proces van target identificatie van diagnostische en prognostische biomarkers in heterogene ziektes als AML.

