

University of Groningen

BH3 profiling to optimize lymphoma treatment

Langendonk, Myra

DOI:
[10.33612/diss.689851585](https://doi.org/10.33612/diss.689851585)

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:
2023

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

Citation for published version (APA):

Langendonk, M. (2023). *BH3 profiling to optimize lymphoma treatment: Pre-clinical studies*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.689851585>

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

Author affiliations

Emanuele Ammatuna¹

Anke van den Berg²

Arjan Diepstra²

Andor Glaudemans³

Gerwin Huls¹

Mathilde de Jong¹

Tom van Meerten¹

Marcel Nijland¹

Wouter Plattel¹

Bart Reitsma¹

Johannes Seiler⁴

Nienke Smit¹

Lydia Visser²

1. Department of Hematology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands.
2. Department of Pathology and Medical Biology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands.
3. University of Groningen, University Medical center Groningen, Department of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Groningen, The Netherlands.
4. University of Groningen, ERIBA, Genomic Instability in Development and Disease, Groningen, the Netherlands.

BH3 Profiling to Optimize Lymphoma Treatment

Preclinical Studies

Diffuus grootcellig B-cellymfoom is het meest voorkomende type lymfoom en ook een van de meest agressieve lymfomen. De huidige therapie met R-CHOP (het monoklonale antilichaam rituximab in combinatie met cyclofosfamide, doxorubicine, vincristine en prednisolon) geneest ongeveer 60% van de patiënten, wat helaas betekent dat 40% van de patiënten een recidief of refractaire ziekte ervaart. In dit proefschrift zijn we op zoek gegaan naar nieuwe behandeldoelen voor de behandeling van DLBCL om hopelijk de huidige behandeling voor patiënten te verbeteren.

Met het gebruik van een genoombrede CD20-schuld-door-associatie-assay hebben we eerder de oestrogeenreceptor- β (ER β) geïdentificeerd als een nieuw potentieel doelwit voor de behandeling van DLBCL. In **Hoofdstuk 2** laten we een significant hogere expressie van de ER β in DLBCL in tegenstelling tot normale B-cellen, en een hoge eiwitexpressie in DLBCL-cellijnen zien met behulp van western blot en immunohistochemie. Deze eiwitexpressie werd ook bevestigd in patiënten monsters door immunohistochemie en met een FES-PET-scan bij een patiënt met DLBCL, welke wees op verhoogde expressie van de ER-receptor. Daarnaast veroorzaakte behandeling met de selectieve oestrogeenreceptormodulator (SERM) tamoxifen doormiddel van apoptose verminderde cel levensvatbaarheid in alle geteste DLBCL-cellijnen. Dit effect op de levensvatbaarheid van de cellen was significant verminderd in een ER β knock-out cellijn. We konden ook bevestigen dat in de aanwezigheid van oestrogeen het effect van tamoxifen op de levensvatbaarheid van de cellen verminderd was, wat suggereert dat de ER β beschermt tegen apoptose. Het anti-tumoreffect van tamoxifen werd verder bevestigd in een xenograft-muismodel met verminderde tumorgroei en significant verbeterde overleving bij behandeling met tamoxifen. Ten slotte hebben we een landelijke, populatie-gebaseerde studie uitgevoerd om de incidentie van DLBCL te beoordelen bij borstkankerpatiënten die werden behandeld met tamoxifen, en de DLBCL-incidentie was significant verminderd door behandeling met tamoxifen in vergelijking met aromataseremmers of geen hormoontherapie bij borstkankerpatiënten.

Vanwege de veelbelovende resultaten voor de behandeling van DLBCL met tamoxifen besloten we vervolgens te onderzoeken of de combinatie van tamoxifen met de BCL-2-remmer venetoclax mogelijk gunstig zou zijn voor de behandeling van lymfoom, aangezien tamoxifen apoptose induceert en de combinatie met een anti-apoptotische behandeling het effect van beide mogelijk zou kunnen versterken in **Hoofdstuk 3**. Eerst hebben we het werkingsmechanisme van tamoxifen bij zowel DLBCL als mantelcellymfoom (MCL) onderzocht om te zien of de combinatie van beide middelen gunstig zou kunnen zijn. Behandeling met tamoxifen induceerde apoptose en productie van zuurstofradicalen (ROS), evenals verminderde metabolische activiteit in zowel DLBCL- als MCL-cellijnen. Met western blot en fluorescentiemicroscopie werd de lokalisatie van de ER β in de mitochondriën van DLBCL-cellen vastgesteld. Vervolgens konden we vaststellen dat

behandeling met tamoxifen de afhankelijkheid van BCL-2 in DLBCL-cellijnen en van BCL-XL in MCL-cellijnen verhoogde, wat werd gevalideerd met combinatie-experimenten waarbij de IC50 voor venetoclax en navitoclax afnam in overeenstemming met de verandering in anti-apoptotische afhankelijkheid. Bovendien waren de BAD- en ROS-niveaus positief gecorreleerd en blokkeerde het remmen van de ROS-productie het effect van tamoxifen op de ROS-productie en de afhankelijkheid van BAD. Knock-out van ER β verminderde ook de ROS-productie en BAD-afhankelijkheid aanzienlijk na behandeling met tamoxifen. Om deze resultaten te kunnen vertalen naar patiënten hebben we *ex vivo* dynamische BH3-profilerings- en validatie-experimenten uitgevoerd op tien DLBCL- en tien MCL-patiënten monsters. In alle gevallen was de combinatie van tamoxifen en venetoclax additief of synergistisch, wat aangeeft dat de combinatie waarbij tamoxifen gevoeliger maakt voor venetoclax gunstig zou kunnen zijn voor de behandeling van lymfomen.

Aangezien de combinatie van gerichte therapieën veelbelovend is bij verschillende vormen van kanker en met name de combinatie van venetoclax en ibrutinib bij een deel van de MCL-patiënten, wilden we in **Hoofdstuk 4** kijken of we de respons in *ex vivo* patiënten monsters konden voorspellen. Met behulp van BH3-profilering hebben we de anti-apoptotische afhankelijkheidsprofielen van 9 DLBCL- en 9 MCL-patiënten monsters vastgesteld. We gebruikten ook immunohistochemie om de anti-apoptotische eiwitexpressie te controleren en behandelden de cel suspensies van de patiënten met ibrutinib en venetoclax. De meeste patiënten monsters brachten meerdere anti-apoptotische eiwitten tot expressie en dynamische BH3-profilering was indicatief voor venetoclax gevoeligheid in sommige patiënten monsters. Uiteindelijk was de gevoeligheid voor ibrutinib en venetoclax de beste manier om te voorspellen of de combinatietherapie additief of synergetisch zou zijn, en dit zou kunnen worden gebruikt om de behandelingsrespons voor patiënten te voorspellen.

Het huidige onderzoek naar de behandeling van Hodgkin-lymfoom (HL) is meer gericht op het vinden van mildere en meer gerichte therapieën, aangezien late bijwerkingen van de behandeling zorgwekkend zijn bij de meestal jongere patiënten. Aangezien een van de kenmerken van HL het ontwijken van apoptose is, wilden we het gebruik van anti-apoptotische middelen onderzoeken in HL in **Hoofdstuk 5**. We stelden eerst vast dat bijna alle HL-patiënten monsters twee of meer anti-apoptotische eiwitten tot expressie brachten door middel van immunohistochemie op 84 patiënten monsters. In HL-cellijnen hebben we ook de anti-apoptotische eiwitprofielen vastgesteld met zowel western-blot als BH3-profilering welke overeenkwamen met de patiëntresultaten. Omdat we eerder hebben aangetoond dat tamoxifen de anti-apoptotische afhankelijkheid in DLBCL kan veranderen, wilden we dit ook in HL testen, omdat dit mogelijk het effect van BH3-mimetica in HL zou kunnen versterken. We hebben ook doxorubicine getest omdat dit de standaardbehandeling is in HL. ER β -expressie werd bevestigd in zowel monsters van HL-patiënten als cellijnen, evenals een mitochondriale lokalisatie vergelijkbaar met het expressiepatroon in DLBCL. De effectiviteit van de combinatie van tamoxifen en BH3-mimetica varieerde tussen cellijnen en tussen BH3-mimetica, wat kon worden voorspeld met behulp van BH3-profilering. De combinatie met doxorubicine was het meest effectief met een BCL-XL-remmer en navitoclax. Deze gecombineerde resultaten bieden een veelbelovende strategie voor de behandeling van HL

met een combinatie van tamoxifen of doxorubicine in combinatie met een meervoudige anti-apoptotische remmer zoals navitoclax.

Voor DLBCL wordt algemeen aangenomen dat het belangrijkste anti-apoptotische kenmerk het gevolg is van BCL-2-expressie, aangezien dit sterk correleert met resistentie tegen R-CHOP. We wilden onderzoeken of andere anti-apoptotische eiwitten ook bijdragen aan R-CHOP-resistentie in DLBCL. In **Hoofdstuk 6** vonden we een hoge expressie van de anti-apoptotische eiwitten BCL-2, MCL-1 en BCL-XL in zowel DLBCL-patiënten monsters als cellijnen met behulp van immunohistochemie en western-blot. Met het gebruik van dynamische BH3-profilering werden veranderingen na CHOP-behandeling van DLBCL-cellijnen beoordeeld en gevalideerd, wat een heterogene verhoogde gevoeligheid voor verschillende BH3-mimetica in de verschillende cellijnen aantoonde. Deze verhoogde gevoeligheid zou ook kunnen worden gerepliceerd met alleen doxorubicine of vincristine, wat een mogelijke klinische mogelijkheid biedt voor de combinatietherapie van doxorubicine of vincristine met BH3-mimetica. Bovendien biedt dit een nieuw perspectief op de behandeling van CHOP-resistente DLBCL, aangezien CHOP-behandeling een verhoogde anti-apoptotische afhankelijkheid van niet alleen BCL-2 maar ook MCL1 en BCL-XL induceert.

Dankwoord

Graag wil ik bij deze persoonlijk de mensen bedanken zonder wiens hulp en toewijding dit proefschrift niet tot stand gekomen was.

Allereerst wil ik graag mijn (co)promotoren **dr. Tom van Meerten, dr. Lydia Visser, prof. dr. Gerwin Huls** en **prof. dr. Anke van den Berg** bedanken.

Beste Tom, ik kan het me nog goed herinneren dat ik je in het trappenhuis tegenkwam nadat ik tijdens mijn masteronderzoek wat experimenten voor je had uitgevoerd, en dat je me toen vroeg of ik een PhD zou willen doen. Op dat moment moest ik nog anderhalf jaar, dus dat ging niet, maar uiteindelijk is het toch zover gekomen! Bedankt voor de kans om bij jouw groep aan te sluiten, ervaringen op te doen en voor alle inzichten in het klinisch onderzoek.

Lieve Lydia, ik weet zeker dat ik niet de eerste ben die het zegt, en ook zeker niet de laatste zal zijn die het zegt, zonder jou zou ik mijn PhD nooit gehaald hebben. Vanaf het eerste moment dat ik bij jou in het lab kwam voor mijn masteronderzoek tot het afronden van mijn proefschrift was je er altijd, voor alle praktische uitleg, maar ook wijze raad, goede gesprekken en veel gelach. De positiviteit die jij uitstraalt is iets waar ik ontzettend veel bewondering voor heb en die me altijd bij zal blijven. Ik hoop dat je nog vele jaren met veel plezier de boel zal laten draaien bij de pathologie en nogmaals ontzettend bedankt voor alle hulp en ondersteuning.

Beste Gerwin, bedankt voor de prettige samenwerking, begeleiding en het enthousiasme over de resultaten en mogelijkheden tijdens onze meetings.

Beste Anke, ik weet nog de eerste keer dat ik bij je langskwam voor een masteronderzoek een aantal jaar geleden, wat nu uiteindelijk geleid heeft tot een PhD. Bedankt voor alle input die je altijd hebt gegeven en dat ik altijd langs kon komen als er iets was.

De leden van de leescommissie **prof. dr. J.J. Schuringa, prof. dr. Geke Hospers** en **prof. dr. Monique Minnema**. Bedankt dat u de tijd en moeite heeft genomen om mijn proefschrift te lezen en beoordelen.

Veel dank gaat naar mijn paranimfen, **Nienke Smit** en **Floris Liefverink**.

Lieve Nienke, ik ben ontzettend blij dat je na je stage aangenomen werd bij onze groep als analist. Wat heb je ontzettend veel gedaan, niets was voor jou te veel. Het was altijd gezellig en leuk om met jou samen te werken en gelukkig zetten we de traditie van koffie drinken nog steeds door. Laten we dit vooral vol houden!

Lieve Floris, ik kan me geen een keer herinneren dat je me niet vroeg: en, is het al dokter Myra? Je was altijd super enthousiast en ik vind het erg leuk dat je erbij bent nu het zover is!

Dan zijn er natuurlijk mijn **kamergenoten en mede PhD studenten**.

Beste Mathilde, naast Lydia heb ik denk ik het meest van jou geleerd. Vanaf het eerste

moment dat ik als PhD begon heb je me altijd geholpen met alles. Daarnaast was het ook nog eens ontzettend gezellig, van samen experimenten inzetten, naar congressen gaan, koffie drinken, winkelen (daar ben je erg goed in!), lekker eten tot goede borrels. Ontzettend bedankt voor alle support en gezelligheid, en ik wens je heel veel succes en goeds in Keulen. En laten we vooral snel weer afspreken om sushi te eten met een wijntje erbij!

Beste Siobhan, Ik vind het nog steeds grappig dat we samen op de middelbare school hebben gezeten, maar pas vrienden werden in Groningen. Het was altijd leuk om van jou de ins en outs te horen van het lab en de bijbehorende inzichten. Bedankt voor de support, gezelligheid, de borrels, kaasfondue, sushi-dates en natuurlijk niet te vergeten de lay-out van dit proefschrift. Ik kijk er naar uit om binnenkort jullie nieuwe kleine te mogen bewonderen!

Beste Johanna, we hebben lang een kamer gedeeld en het was altijd erg gezellig. Natuurlijk ook bedankt voor je hulp met de kleuringen! Ik vind het ontzettend knap dat je je PhD zo snel hebt weten af te ronden en ik wens je heel veel succes in je nieuwe baan!

Also many thanks to **former and current PhD students: Rianne, Melanie, Fubiao, Peijia, Larissa, Pei, Geok Wee, Yichen, Weiting and Xing**. Thanks for all the good times, good food, really nice snacks and office laughs.

Daarnaast natuurlijk ook alle **analisten van het O&O en DNA lab: Bea Rutgers, Marian Bulthuis, Marjan Reinders-Luinge, Wierd Kooistra, Monique Lodewijk, Tineke van der Sluis, Jasper Koerts, Debora de Jong, Annika Seitz, Mirjam Mastik en Lorian Slagter-Menkema**, bedankt voor alle hulp, uitleg, wijze raad en gezelligheid!

Ook wil ik graag alle **co-auteurs** bedanken voor de samenwerking en input op de stukken in dit proefschrift: **Arjan Diepstra, Jonas Seiler, Bart Reitsma, Manu Ammatuna, Andor Glaudemans, Wouter Plattel en Marcel Nijland**.

Buiten mijn collega's om zijn er ook veel mensen waar ik veel aan heb gehad de afgelopen jaren.

Lieve Lisanne, Margot, Renske en Vanessa, onze vriendschap is tijdens de studie ontstaan, en er is ontzettend veel veranderd sinds die tijd (verhuizingen, banen, kinderen en nog veel meer). Maar wat ontzettend fijn om jullie nog altijd als vriendinnen te hebben. Ik hoop dat we nog veel weekendjes/etentjes en borrels en gezelligheid zullen hebben!

Lieve **Aileen, Anneke, Annelies, Arnoud, Astrid, Danny, Gido, Gea, Gert, Heleen, Klaas, Marieke, Marijn, Marjolein, Michiel, Patrick en Sandra** (in alfabetische volgorde ;)). Bedankt voor alle gezellige avonden, etentjes, borrels, dagjes weg en alles wat ik verder vergeet. Ik hoop dat er nog vele zullen volgen!

En dan **mijn familie!**

Lieve George, Jeanet, Jasmine en Gerben en Merlijn. Het rotsvaste vertrouwen dat het goed zou komen wist mij altijd op te beuren. Bedankt dat jullie er altijd waren als ik mijn ei kwijt moest en voor alle steun door de jaren heen. Het was altijd weer fijn om thuis te komen.

Lieve Tristan, ook al wilde ik soms helemaal geen advies maar gewoon even kunnen zeuren, ik heb heel veel steun aan je gehad. Helemaal op het einde wist je me te motiveren om de laatste eindjes aan elkaar te knopen. Nu heb ik alle tijd om weer verder te klussen in ons nieuwe huis!

About the author

Myra Langendonk was born on the 18th of May 1988 in Hardenberg, the Netherlands. She graduated from OSG Erasmus in Almelo in 2007. In the same year, she started her university education at the Rijksuniversiteit Groningen, with the bachelor Pharmacy. This was then followed by the master Medical Pharmaceutical Sciences with a specialization in Science, Business and Policy. The past six and a half years she has been working on her PhD project at the University Medical Center Groningen under the supervision of dr T. van Meerten and dr. L. Visser, in a collaboration between the department of Hematology and the department of Pathology. Currently, Myra works at QPS Netherlands B.V. as a Medical Writer.

Publications

1. Wu R, Nijland M, Rutgers B, Veenstra R, **Langendonk M**, van der Meeren LE, Kluin PM, Li G, Diepstra A, Chiu JF, van den Berg A, Visser L. Proteomics Based Identification of Proteins with Deregulated Expression in B Cell Lymphomas. *PLoS One*. 2016 Jan 11;11(1):e0146624. doi: 10.1371/journal.pone.0146624.
2. de Jong MRW, **Langendonk M**, Reitsma B, Herbers P, Nijland M, Huls G, van den Berg A, Ammatuna E, Visser L, van Meerten T. WEE1 Inhibition Enhances Anti-Apoptotic Dependency as a Result of Premature Mitotic Entry and DNA Damage. *Cancers (Basel)*. 2019 Nov 7;11(11):1743. doi: 10.3390/cancers11111743.
3. de Jong MRW, **Langendonk M**, Reitsma B, Nijland M, van den Berg A, Ammatuna E, Visser L, van Meerten T. Heterogeneous Pattern of Dependence on Anti-Apoptotic BCL-2 Family Proteins upon CHOP Treatment in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 30;20(23):6036. doi: 10.3390/ijms20236036.
4. de Jong MRW, **Langendonk M**, Reitsma B, Herbers P, Lodewijk M, Nijland M, van den Berg A, Ammatuna E, Visser L, van Meerten T. WEE1 inhibition synergizes with CHOP chemotherapy and radiation therapy through induction of premature mitotic entry and DNA damage in diffuse large B-cell lymphoma. *Ther Adv Hematol*. 2020 Jan 20;11:2040620719898373. doi: 10.1177/2040620719898373.
5. **Langendonk M**, de Jong MRW, Smit N, Seiler J, Reitsma B, Ammatuna E, Glaudemans AWJM, van den Berg A, Huls GA, Visser L, van Meerten T. Identification of the estrogen receptor beta as a possible new tamoxifen-sensitive target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 2022 Mar 7;12(3):36. doi: 10.1038/s41408-022-00631-7.
6. **Langendonk M**, Smit NAM, Plattel W, Diepstra A, Meerten TV, Visser L. Navitoclax Most Promising BH3 Mimetic for Combination Therapy in Hodgkin Lymphoma. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 9;23(22):13751. doi: 10.3390/ijms232213751.