

VU Research Portal

Characterization of relapsed Acute Myeloid Leukemia

Bachas, C.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Bachas, C. (2014). *Characterization of relapsed Acute Myeloid Leukemia*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

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.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Chapter 8 Nederlandse samenvatting

Karakterisering van recidief Acute Myeloide
Leukemie

Inleiding

Acute myeloïde leukemie (AML) is een bloedkanker. Circa 30% van kinderen met kanker heeft leukemie en ongeveer 15% hiervan lijdt aan de variant AML. Onder kinderen komt AML het meest voor bij pasgeborenen en zuigelingen. De incidentie neemt dan af voor kinderen tot een jaar of 9 oud en vervolgens geleidelijk weer toe (Figuur 1, **hoofdstuk 1**). Bij volwassenen neemt de incidentie onder mensen van 45 jaar en ouder flink toe. De kans op het krijgen van AML is ongeveer 1 op 250. In Nederland krijgen ongeveer 610 mensen per jaar AML, waarvan 25 kinderen. In datzelfde jaar zullen circa 475 mensen, waarvan 8 kinderen, overlijden aan de ziekte.

In het merg van beenderen als de schedel, wervels of het borstbeen, worden dagelijks miljarden bloed cellen aangemaakt, dit proces heet hematopoëse (Figuur 3, **hoofdstuk 1**). Beenmerg is rijk aan onrijpe cellen, zogenaamde stamcellen, die bij een vermeerdering zichzelf reproducteren en tegelijk een dochtercel maken. De stamcellen kunnen aanleiding geven tot elk type bloedcel. De eerste dochtercellen, ook wel progenitorcellen of blasten genoemd, zijn nog steeds vrij onrijp, maar differentiëren zich na verdere celdelingen naar een specifiek bloedceltype. De rijpe cellen hebben een beperkte levensduur. De rijpere cellen zijn de rode bloedcellen die voor zuurstoftransport zorgen, bloedplaatjes die een rol spelen bij bloedstolling en witte bloedcellen die het afweersysteem verzorgen. Witte bloedcellen kunnen in grofweg twee celtypen onderscheiden worden: De lymfatische cellen specifieke ziekteverwekkers (een bacterie of een virus) herkennen en de myeloïde cellen die, na activatie, zorgen voor het grove, minder specifieke geschut.

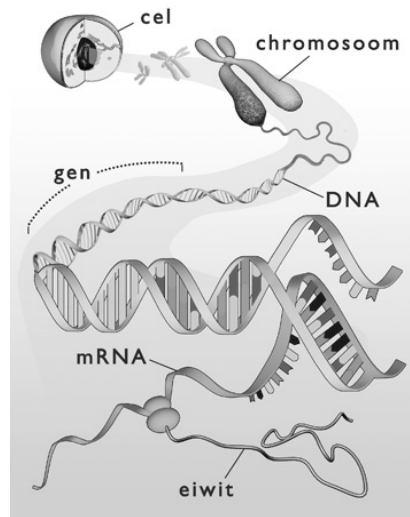
Bij een leukemie ontspoord de bloedcelvorming in de onrijpere stam- of progenitorcellen. De cellen differentiëren niet of nauwelijks meer en gaan wel ongecontroleerd delen. Deze cellen, die leukemie blastcellen genoemd worden, verdringen de gezonde progenitorcellen in het beenmerg en het bloedbeeld verarmt: er is geen variatie van de nodige celtypen meer en er zijn voornamelijk leukemie blastcellen te zien. De diagnose wordt nog altijd met een microscopische techniek gesteld. Door het ontbreken van de gezonde cellen wordt de patiënt ziek en krijgt bijvoorbeeld stollingsproblemen en/of zuurstoftekort in weefsels en/of een verminderde afweer.

Het ontsporen van AML cellen wordt veroorzaakt door fouten in het erfelijk materiaal (DNA, zie "Intermezzo" verderop), die het gevolg zijn van UV straling, toxische stoffen, virussen of radioactiviteit. Het DNA is goed beschermd en er zijn ook mechanismen in een cel aanwezig om schade te herstellen. Als een gezonde cel de schade niet kan herstellen zal deze tot zelfdoding overgaan door signalen uit te zenden waardoor het afweersysteem de cel elimineert. In kankercellen falen deze mechanismen. De DNA schade, ook wel mutatie genoemd, kan bijvoorbeeld een breuk in een chromosoom of een verkeerde ATCG code zijn. Een opeenstapeling van dit soort DNA schade zorgt voor niet of anders functionerende eiwitten, waardoor de biologische processen in cellen ontregeld raken en kanker ontstaat.

AML is een heterogene ziekte en verschillende typen AML worden gekenmerkt door specifieke mutaties, zoals het koppelen van chromosoom 8 aan een deel van chromosoom 21. Een bekende genmutatie is een foutief herhalend stuk DNA code in het *FLT3* gen, dat een rol speelt in stamcellen. Mutaties in dit gen komen in circa 10% van alle kinderen met AML voor, maar met name in patiënten waarbij er geen chromosomale afwijkingen lijken te zijn. Andere voorbeelden van vaker voorkomende genmutaties zijn *NPM1*, *WT1*, *RAS* of *CEBPa* gen mutaties. Veel genmutaties zijn gerelateerd aan prognose voor de patiënt.

Intermezzo

DNA (Engels: DeoxyriboNucleic Acid) bestaat uit twee bijzonder lange moleculen, die opgebouwd zijn uit verschillende combinaties van vier simpelere eenheden; de nucleotiden, dat zijn moleculen die bestaan uit verbindingen van Adenine, Thymin, Cytosine en Guanine verbindingen, afgekort respectievelijk A, T, C en G. De twee lange DNA moleculen zijn verstrengeld en vormen een molecuul doordat de code complementair is; een A paart altijd met een T en een C altijd met een G. De strengen van DNA zijn complex samen gevouwen en vormen in de kern van cellen de chromosomen. Iedere cel heeft twee kopieën van 22 chromosomen en daarbij twee X chromosomen (vrouwen) of één X en één Y chromosoom (mannen). DNA bestaat voor een groot deel uit gebieden, de genen, die een nauwgezette combinatie van de ATCG code vormen. Alle genen samen noemt men het genoom. De code van één gen ligt vaak enigszins verspreid over een bepaalde regio van het DNA; tussen de coderende gebieden zitten gebieden die niet coderen. Via een tussencode genaamd RNA (Engels: RiboNucleic Acid), waarin de coderende gebieden uit DNA worden overgeschreven tot een molecuul dat aan één stuk codeert. De mate waarin DNA overgeschreven wordt naar RNA noemen we genexpressie. Genexpressie wordt in belangrijke mate bepaald door de aanwezigheid van zogenaamde transcriptiefactoren. Via RNA kan een gen vertaald kan worden in een eiwit. Hoe hoger de RNA expressie, hoe meer eiwit er in het algemeen gemaakt wordt. Eiwitten zijn de functionele bouwstenen van cellen. Er zijn eiwitten met bijvoorbeeld een functie in de structuur van een cel of in processen als uitrijping of het delen van cellen.



Figuur 1. Schematische tekening van de organisatie van DNA in de cel kern en het vertalen van de DNA code via RNA naar eiwit.

Bron: <http://leukemie.jouwweb.nl/de-diagnostiek>

AML is lang een ziekte geweest waaraan bijna als iedere patiënt na diagnose snel dood ging. Experimenten na de eerste wereldoorlog met mosterdgas introduceerden chemotherapie voor kankerpatiënten. Middelen die het vermeerderen van DNA tijdens de frequente celdelingen van kankercellen verstoren bleken erg succesvol als therapie. De sterkste verbeteringen vonden pas na de jaren '70 plaats. Tegenwoordig krijgen kinderen gemaximaliseerde doses van middelen als cytarabine (Ara-C), Daunorubicine (DNR) en Etoposide (VP16). Dit is mogelijk gemaakt door uitgebreid onderzoek naar het intensiveren van chemotherapie, maar ook door optimaliseren van patiëntenzorg. Hierdoor bereikt ruim 90% van de kinderpatiënten het eerste herstel van de ziekte (complete remissie); leukemie cellen verdwijnen uit het beenmerg, het normale bloedbeeld herstelt en symptomen verdwijnen. Helaas krijgt circa 30% van deze patiënten de ziekte weer terug. Na dit zogenoemde recidief, reageren patiënten slecht op nieuwe chemotherapie en de meeste patiënten zullen sterven. Circa 65% van de kinderen met AML leeft langer dan 5 jaar na diagnose van de ziekte.

De laatste jaren zijn er nog steeds verbeteringen, maar het gaat niet zo snel meer; er lijkt een plateau bereikt te zijn. Om de uitkomsten voor AML patiënten verder te verbeteren wordt er naar nieuwe behandelwijzen gezocht. Er worden veel nieuwe medicijnen ontwikkeld die gericht zijn op de gemuteerde eiwitten van een patiënt, dit heet 'targeted therapy'. Door de verschillen in mutaties tussen patiënten zal er uiteindelijk een therapie op maat aangeboden moeten worden ('personalized treatment').

Het aanslaan van chemotherapie kan tijdens de behandeling gevolgd worden met behulp van moderne, gevoelige cel- of moleculair-biologische technieken waarbij de minimale rest ziekte ('Minimal Residual Disease', afgekort MRD) wordt bepaald. Met moleculaire technieken kan men de mutaties van zeer kleine hoeveelheden leukemiecellen, aanwezig te midden van een veelvoud van gezonde cellen, in het herstellend beenmerg detecteren. Bij een andere zeer gevoelige techniek (flowcytometrie) worden meer aantallen cellen gedetecteerd, met de afwijkende samenstelling van eiwitten ten gevolge van mutaties. De technieken zijn zo gevoelig dat bij kinderen en volwassenen binnen drie weken na begin van de behandeling kan worden ingeschat of er een verhoogd risico op recidiveren en overlijden is. Momenteel lopen er klinische studies die onderzoeken of aanpassen van de behandeling na het detecteren van MRD de overleving van patiënten kan verbeteren.

Meer inleidende details vindt u in **hoofdstuk 1**.

Doel van dit proefschrift

Het is niet goed duidelijk waarom een deel van de patiënten recidiveert en hoe dit voorkomen kan worden. Er is bijvoorbeeld onderzoek gedaan naar cellulaire pompen die toxische stoffen uit cellen verwijderen en biologische beschikbaarheid en afbraak van chemotherapeutica in cellen. Ook zijn verspreiding en halfwaardetijd van chemotherapeutica in het lichaam onderzocht, alsmede een aantal biologische en klinische factoren; echter, de exacte moleculaire en cellulaire mechanismen die het recidief veroorzaken zijn tot nu toe grotendeels onbekend. Het voorkomen van het recidief of verbeteren van de behandeling van gerecidiveerde AML patiënten lijken de beste opties om de vooruitzichten voor AML patiënten te verbeteren. In dit proefschrift is getracht factoren te vinden die een toekomstige keuze voor een behandeling van gerecidiveerde AML patiënten kunnen leiden en/of mogelijkheden voor nieuwe vormen van behandeling bieden.

Resultaten in dit proefschrift

In **hoofdstuk 2**, zijn gepaarde beenmergmonsters, afgenomen ten tijde van diagnose en recidief, van 69 individuele patiënten vergeleken. Er is gekeken of de frequentie van genmutaties die zich lenen voor doelgerichte therapie in beide monsters hetzelfde was. Het bleek dat het mutatiepatroon verschoven was in maar liefst 61% van de patiënten met deze genmutaties in enige stadium van de ziekte. Patiënten die bij het recidief een *FLT3*, *WT1* of *RAS* mutatie behielden of verkregen, recidiveerden veel sneller dan patiënten zonder deze mutaties of patiënten die deze mutaties alleen bij diagnose hadden. Bovendien waren de veranderingen in mutatiestatus ook geassocieerd met de overleving van de patiënten, patiënten met gemuteerde genen bij het recidief hadden een slechte overleving. Dit suggereert dat deze genen een rol spelen in de voortgang van de ziekte, ná het starten van de eerste behandelingen.

Om beter in kaart te brengen welke genmutaties van belang zijn voor de voortgang van de ziekte ná het recidief, zijn in **hoofdstuk 3** de mutatiefrequenties van relevante genen bestudeerd in de recidiefmonsters van 198 kinderen met AML, waarvan het recidief uniform was behandeld. Deze studie liet zien dat de mutaties in het *WT1* gen bij het recidief sterk associëren met het opnieuw recidiveren van de patiënt, ná behandeling van het eerste recidief. Bovendien reduceren mutaties in het *FLT3* gen de overlevingskansen ná het recidief. De frequentie van mutaties waarvoor 'targeted therapies' zijn of worden ontwikkeld bedroeg meer dan 25% en dit biedt mogelijkheden voor het behandeling van recidief AML.

In onze moleculaire analyses, zagen wij dat er bij sommige patiënten vóór behandeling signalen van mutaties gedetecteerd konden worden die tegen de detectielimiet van de techniek zaten. Later, bij het eerste recidief, bleek deze unieke mutatie te domineren in de analyse. Dit leidde tot de hypothese dat een AML bij diagnose mogelijk 'oligoclonaal' is, d.w.z. dat bij diagnose (vóór behandeling) de AML uit een heterogene populatie van moleculaire varianten bestaat. De variant die bij diagnose domineert, wordt door therapie geëlimineerd, waarna een therapie-resistente en bij diagnose nauwelijks waar te nemen variant uit kan groeien tot het recidief. Dit is ook een mogelijke verklaring voor de mutatieveranderingen tussen diagnose- en het recidiefmonster.

In **hoofdstuk 4** is deze hypothese onderzocht: Er is in gepaarde monsters van 7 AML patiënten gekeken, hoe de verdeling van een aantal vaker voorkomende en relevante mutaties was in subfracties van leukemiecellen. We isoleerden met behulp van flowcytometrie enkele tientallen leukemiecellen op basis van eiwitten aan het celoppervlak, waarvan de mate van gecombineerde aanwezigheid AML stamcellen, progenitoren of rijpere AML cellen typeert. Zo kenmerkt veel van het eiwit CD34 en afwezigheid van eiwit CD38 stamcellen, en dit combineerden wij met een merkeiwit dat myeloïde cellen kenmerkt en met een merkeiwit dat niet op een normale myeloïde cel thuis hoort en daarmee de leukemie kenmerkt). Na mutatieanalyses op de geïsoleerde cellen, bleek dat met name de onrijpere AML stamcel en progenitorfracties heterogeen waren in hun mutatie patronen. Bovendien werd in bijna alle patiënten het mutatie profiel dat het recidief kenmerkte terug gevonden in de onrijpere cellen, terwijl dit in het grootste deel van de cellen bij diagnose niet gedetecteerd kon worden. Deze resultaten wijzen erop dat de leukemiecellen van het recidief voornamelijk ontstaan uit een populatie van cellen met recidief-specifieke mutaties, die, vaak in kleine hoeveelheden, al vóór behandeling bestaan.

De bevindingen die hierboven beschreven zijn, laten zien dat het recidief AML klinisch en biologisch een andere ziekteentiteit is dan AML bij diagnose. Verschillen tussen diagnose en bij het recidief, zullen in elk geval deels de functionele eigenschappen (bijv. therapieresistentie) van leukemiecellen van het recidief verklaren. Om te onderzoeken welke biologische routes in een cel specifiek in recidief AML ontregeld zijn, is in **hoofdstuk 5** met behulp van de zogenaamde genoom brede 'micro-array' techniek het RNA uit AML cellen van diagnose vergeleken met het RNA uit cellen van het recidief van dezelfde patiënt; van elk RNA dat voor eiwit codeert is de hoeveelheid bepaald. In ongeveer de helft van de gevallen bleek het patroon van expressie van individuele genen bij het recidief niet op dat bij diagnose te lijken. Dit werd vaker geobserveerd bij patiënten waarbij er ook mutatieveranderingen tussen diagnose en recidief gevonden waren. Bij de individuele genen, waarvan de expressie verschilde tussen diagnose en het recidief, waren er veel gerelateerd aan verstoorde celdifferentiatie of aan de structuur van het DNA. Een computeranalyse die de expressie van genen binnen bekende cellulaire mechanismen en moleculaire routes onderzoekt, liet overtuigend de betrokkenheid zien van de transcriptie factoren *CEBPA*, *GFI1* en *SATB1* zien. Dit zijn transcriptiefactoren met een rol in hematopoëse.

Niet alle patiënten krijgen een recidief en niet alle patiënten met een recidief vertonen mutatie of sterke genexpressie veranderingen tussen diagnose en het recidief. Het zou dus kunnen dat er bepaalde mechanismen al actief zijn bij diagnose – voor de behandeling - die cellen resistent of gevoelig maken tegen chemotherapie. Daarom is in **hoofdstuk 6**, met behulp van de genoom brede 'micro array' techniek, de correlatie van genexpressie met chemotherapie resistentie van leukemiecellen bestudeert in 73 kinderen met AML. De gevoeligheid van leukemiecellen voor chemotherapeutica is *ex vivo* (buiten het lichaam) in een laboratoriumproef getest in zogenaamde drug gevoeligheidstesten. De geteste chemotherapeutica waren: Ara-C, VP16 en DNR, alsmede een meer experimenteel therapeuticum, Cladribine (CdA), dat erg op Ara-C lijkt.

Het aantal genen dat significant correleerde met drug gevoeligheid varieerde per chemotherapeutikum. Bekende en nieuwe genen of moleculaire routes correleerden met drug resistentie. Ara-C gevoeligheid correleerde bijvoorbeeld met de expressie van een aantal *MLL* genen, die in bepaalde AML gevallen gemuteerd zijn. VP16 gevoeligheid correleerde bijvoorbeeld met expressie van het eiwit toposoimerase 2 alpha (*TOP2A*), dat breuken in het DNA maakt tijdens celdeling en direct betrokken is in het werkingsmechanisme van VP16. Opmerkelijk was dat ondanks verschillen in werkingmechanismen van de bestudeerde chemotherapeutica, een voor alle middelen overeenkomstige associatie met de cellulaire signaalroute van het *CD40* molecuul gevonden werd. De associatie van deze route met tumor groei is in andere kanker soorten reeds beschreven. Bovendien worden in een aantal hematologische aandoeningen, waaronder AML, verhoogde niveaus van *CD40* gevonden in bloedserum en zijn er associaties met drug gevoeligheid gevonden in andere bloedkankers. Van belang hierbij is dat er 'targeted therapies' in ontwikkeling zijn die aangrijpen in de *CD40* route. De resultaten worden in meer detail bediscussieerd in **hoofdstuk 7**.

Conclusies

Onze resultaten geven - in overeenstemming met de recente literatuur - aan, dat AML genen kunnen veranderen zijn tussen diagnose en recidief. (**hoofdstuk 2**). Genetische veranderingen zijn van belang voor de prognose van de patient en daarom is het belangrijk dat bij recidief patiënten voor verdere prognose en behandeling (liefst met targeted therapie), kenmerken van het recidief gebruikt worden (**hoofdstuk 2/3**). Recidief AML is een eigen ziektemodaliteit; het is biologisch en klinisch verschillend van AML bij diagnose (**hoofdstuk 2,3,4,5**) en nieuwe behandelingsstrategieën moeten dienovereenkomstig worden ontwikkeld. Wij hebben recidief-specifieke genexpressie profielen aangetoond die opties bieden voor deze nieuwe gerichte methoden (**hoofdstuk 5**). Onze genexpressie studies tonen aan dat meerdere mechanismen leiden tot een resistent fenotype (**hoofdstuk 6**). Daarom kunnen problemen van algehele drug resistentie in recidief AML alleen overwonnen worden, als klassieke chemotherapie en nieuwe gerichte therapieën op een geïndividualiseerde wijze gecombineerd worden.

Het recidief van leukemie wordt in een groot deel van de patiënten veroorzaakt door een zeer kleine populatie van het leukemie stamcelcompartiment, die reeds bestaat vóór de eerste behandeling en na de therapie uitgroeit om het recidief te veroorzaken (**hoofdstuk 4**). Een verfijnde, persoonsgebonden en doelgerichte behandeling moet daarom niet alleen gericht zijn op de juiste genen of moleculaire routes van de AML bij een individuele patiënt, maar ook op de juiste cellen, toegediend op het juiste moment: vroeg tijdens de eerste behandeling. Op die manier is het mogelijk de prognose van patiënten met recidief AML verder te verbeteren.