

VU Research Portal

Identification and characterization of acute myeloid leukemia stem cells

Moshaver, B.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Moshaver, B. (2011). *Identification and characterization of acute myeloid leukemia stem cells*.

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

8

**Samenvatting
voor niet ingewijden**

Samenvatting voor niet ingewijden

Hematopoïese

Bloedcellen worden in het beenmerg gevormd waar de “moedercellen”, de zogenaamde stamcellen, zich bevinden. Deze stamcel kan zich delen waarna één van deze cellen stamcel blijft en de ander zich verder kan vermenigvuldigen (prolifereren) en uitrijpen (differentiëren) tot verschillende soorten bloedcellen: witte en rode bloedcellen en bloedplaatjes. Witte bloedcellen zijn betrokken bij de bescherming van het lichaam tegen infecties, rode bloedcellen zijn verantwoordelijk voor het zuurstoftransport naar de organen en weefsels. Bloedplaatjes zorgen voor bloedstolling na verwondingen. Het proces van proliferatie en differentiatie, waardoor vanuit de stamcel verschillende soorten bloedcellen ontstaan, wordt hematopoïese genoemd.

Leukemie

Het optreden van veranderingen (mutaties) in het erfelijke materiaal (DNA) in de normale hematopoïetische stam- of voorlopercel kan leiden tot een verstoring in de uitrijping, waardoor onrijpe cellen zich in het beenmerg ophopen. Men spreekt dan van een acute vorm van bloedkanker (acute leukemie). De jonge voorlopercellen die zich ophopen, worden kwaadaardige blasten genoemd. Bij het merendeel van de patiënten is niet precies bekend waarom mutaties zijn opgetreden in het DNA van de normale hematopoïetische stam- of voorlopercel. Zeer waarschijnlijk is wel dat er verschillende mutaties moeten plaatsvinden alvorens leukemie ontstaat. Alleen in zeldzame gevallen, zoals na blootstelling aan radioactieve straling, is de oorzaak bekend.

Deze kwaadaardige blasten vermenigvuldigen zich wel, waardoor er een verdringing van de normale bloedcelvorming plaatsvindt. Dit kan leiden tot infecties door een tekort aan witte bloedcellen, bloedarmoede door een tekort aan rode bloedcellen en een verhoogde bloedingsneiging door een tekort aan bloedplaatjes. Onbehandeld leidt dit spoedig tot het overlijden van de patiënt.

Er zijn verschillende soorten leukemiën. Dit proefschrift beschrijft studies over acute myeloïde leukemie (AML).

Acute myeloïde leukemie (AML)

In Nederland wordt per jaar bij ongeveer 550 volwassenen de diagnose AML vastgesteld. Het merendeel van de patiënten is ouder dan 60 jaar.

Om de diagnose AML te stellen wordt bloed- en beenmergonderzoek verricht. Na

kleuringen kan door de microscoop de bloedcelvorming onderzocht worden (de zogenaamde morfologie). In het bloed ontbreken de normale bloedcellen of zijn deze in aantal sterk verminderd. Soms zijn de kwaadaardige blasten al in het bloed aanwezig. Indien meer dan 20% kwaadaardige blasten in het beenmerg aantoonbaar is, spreekt men van een AML. De laatste jaren is meer precieze karakterisering mogelijk door het bepalen van specifieke eiwitten op en in de cel (immunofenotypering met behulp van flowcytometrie) en door het onderzoeken van veranderingen in het erfelijkheidsmateriaal (cytogenetisch onderzoek). Zodoende wordt informatie over de Morfologie – Immunofenotypering – en Cytogenetica (MIC) van de AML verkregen en kunnen diverse subtypes van AML worden vastgesteld. Dit heeft de laatste jaren geleid tot meer specifieke behandelingen voor verschillende vormen van AML dan in het verleden toen AML alleen middels morfologie kon worden onderscheiden. Zo blijkt bijvoorbeeld een AML waarbij met cytogenetisch onderzoek een verlies van diverse chromosomen wordt waargenomen heel slechte vooruitzichten te hebben.

Behandeling van AML

De hoeksteen van de behandeling van patiënten met AML is intensieve chemotherapie waardoor kwaadaardige cellen doodgaan. Als er na die behandeling met het oog door de microscoop minder dan 5% kwaadaardige blasten wordt waargenomen, spreekt men van een complete remissie. Dit is na een eerste intensieve chemotherapiekuur bij 80% van de patiënten jonger dan 65 jaar en 50% van de patiënten ouder dan 65 jaar het geval. Dan wordt er in het algemeen nog een tweede intensieve chemotherapiekuur gegeven. Afhankelijk van het precieze type van de AML (volgens de MIC classificatie zoals hierboven beschreven) zijn er drie behandelmethoden. Er wordt een derde intensieve chemotherapiekuur gegeven, een transplantatie verricht met gezonde beenmergcellen van de patiënt zelf die na de eerste kuur verzameld zijn (autologe transplantatie) ofwel een transplantatie verricht met gezonde beenmergcellen van een donor uit de familie of van de beenmergbank (allogene transplantatie). Dit is nodig om het effect na de eerste kuur te bestendigen. Het wil namelijk niet zeggen dat als er op het oog geen kwaadaardige cellen meer zichtbaar zijn, er helemaal geen leukemiecellen meer aanwezig zijn in het beenmerg.

Minimale restziekte

Helaas komt bij een relatief groot deel van de patiënten met AML de ziekte terug. Dit wordt een recidief AML genoemd. Gedacht wordt dat dit ontstaat uit kleine

aantallen leukemiecellen, die ondanks therapie achterblijven. Dit is de zogenaamde “minimale restziekte”, in het Engels “minimal residual disease” (MRD) genoemd. Deze cellen kunnen door de microscoop niet worden waargenomen, maar wel door immunofenotypering van de eiwitten op deze cellen met behulp van flowcytometrie of door het aantonen van veranderingen in het DNA met behulp van polymerasekettingreacties.

Immunofenotypering kan gebruikt worden om normale voorlopercellen van kwaadaardige stamcellen te onderscheiden. Dit is mogelijk omdat kwaadaardige cellen eiwitten tot expressie kunnen brengen die niet op gewone voorlopercellen aanwezig zijn. Deze eiwitten kunnen worden aangetoond met een antistof die specifiek gericht is tegen dit eiwit. Aan deze antistof wordt een “lampje”, een zogenaamd fluorescent, gekoppeld. Dit fluorescent wordt aangestraald door een laser in de flowcytometer en daarmee kan zelfs binnen een groep van 10.000 normale cellen 1 kwaadaardige cel worden aangetoond. Dit is dus een veel gevoeliger methode dan het oog waarmee maar 1 kwaadaardige cel binnen 100 cellen kan worden aangetoond. Het blijkt dat met deze verfijnde technieken de vooruitzichten van de patiënt veel beter te voorspellen zijn. Van de patiënten van wie op het oog gedacht werd dat zij een complete remissie hadden en dus genezen zouden kunnen zijn, bleek dat degenen waarbij nog restziekte aantoonbaar was een veel hogere kans hadden op terugkrijgen van de ziekte dan de mensen die met immunofenotypering geen restziekte meer hadden.

De gedachte is dat restziekte weer kan uitgroeien tot de ziekte. Om een recidief van de ziekte te kunnen voorkomen in plaats van behandelen, is het van belang de vraag te beantwoorden waarom restziekte aanwezig blijft na behandeling.

Er zijn drie vooronderstellingen m.b.t. deze restziekte: Deze bestaat uit kwaadaardige stamcellen, heeft karaktereigenschappen van een kwaadaardige stamcel of is afkomstig uit een kwaadaardige stamcel. In dat geval zijn er dus nog kwaadaardige stamcellen aanwezig. Zoals in het begin van deze samenvatting genoemd, kan een normale stamcel zich delen waarna 1 cel een rustende stamcel blijft en de ander kan gaan delen en uitrijpen. Een kwaadaardige stamcel kan dit maar in zeer beperkte mate. Omdat kwaadaardige stamcellen over het algemeen rustend zijn en verankerd in een zogenaamde stamcelniche, zijn ze vaak ongevoelig voor chemotherapie.

Het onderzoeken van de eigenschappen van stamcellen is van groot belang omdat we aan de ene kant stamcelrestziekte na behandeling kunnen vaststellen en aan de andere kant deze eigenschappen wellicht kunnen gebruiken voor de ontwikkeling van nieuwe vormen van therapie.

Onderzoek

In dit proefschrift wordt het onderzoek naar de kwaadaardige stamcellen beschreven. Ten eerste is het van belang de normale stamcel, die verantwoordelijk is voor de normale bloedcelvorming, te kunnen onderscheiden van de kwaadaardige stamcel die verantwoordelijk is voor het ontstaan maar ook voor de hernieuwde uitgroei van leukemie. Dit is vooral belangrijk om de kwaadaardige stamcellen te kunnen aantonen in beenmerg van patiënten die al behandeld zijn waarin alleen nog minimale restziekte aanwezig is en de normale bloedcelvorming weer gaat toenemen. Hiertoe hebben wij verschillende oppervlaktekenmerken met behulp van immunofenotypering onderzocht. Omdat hiermee niet alle kwaadaardige stamcellen in alle AML patiënten aantoonbaar zijn, hebben wij tevens naar een alternatieve stamcelpopulatie de zogenaamde “side population” gekeken. Stamcellen hebben namelijk speciale pompen om schadelijke stoffen uit te pompen en de activiteit hiervan kan ook met behulp van immunofenotypering onderzocht worden. Daarnaast is gekeken hoe deze twee op verschillende wijzen aangevoerde stamcelcompartimenten zich tot elkaar verhouden.

Als laatste is gekeken naar de rol van de beschermende beenmergmicro-omgeving. Zoals eerder gemeld bevindt de stamcel zich waarschijnlijk in een beschermende stamcelniche. Omdat die niche niet precies is gekarakteriseerd, hebben wij onderzocht of en hoe de beenmergmicro-omgeving, voornamelijk bestaande uit fibroblasten, macrofagen en vetcellen en hun geproduceerde eiwitten, de kwaadaardige blasten beschermen tegen celdood.

Resultaten

In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de klinische kenmerken en de behandeling van AML. Het nut van het aantonen van minimale restziekte en de daarvoor beschikbare technieken wordt besproken. Daarna wordt ingegaan op de verschillende oorzaken van het achterblijven van minimale restziekte na behandeling, zoals specifieke kenmerken van de AML zelf, bescherming door de beenmergmicro-omgeving en de therapieongevoeligheid van kwaadaardige stamcellen. Met name op de laatste twee oorzaken wordt in de rest van het proefschrift dieper ingegaan.

In **hoofdstuk 2** wordt beschreven hoe normale stamcellen van kwaadaardige stamcellen kunnen worden onderscheiden. In het algemeen bevinden normale

stamcellen zich in een groep cellen die een bepaald oppervlakte kenmerk, CD34, tot expressie brengen. Daarnaast missen stamcellen juist CD38. In deze groep cellen bevindt zich ook de kwaadaardige stamcel. Vandaar dat wij meerdere oppervlaktekenmerken onderzocht hebben om normale van kwaadaardige stamcellen te kunnen onderscheiden. Wij konden aantonen dat het C-type lectin-achtige molecule-1 (CLL-1) nooit op normale stamcellen aanwezig bleek te zijn, maar wel op kwaadaardige stamcellen. Dit bleek bij het stellen van de diagnose maar ook in geval van minimale restziekte, als de normale bloedcelvorming zich weer aan het herstellen was en er in het algemeen meer normale voorlopercellen aanwezig zijn (het zogenaamde regenereren). In aanvulling op CLL-1 toonden wij nog een aantal specifieke kenmerken aan. Hiermee zijn we in staat zowel bij diagnose maar ook na therapie het aantal kwaadaardige stamcellen aan te tonen. Hiermee kan in de toekomst worden vastgesteld of een hoog aantal kwaadaardige stamcellen een slechter vooruitzicht voor de patiënt betekent. Indien dit het geval is, zou een agressievere of liefst stamcelspecifieke therapie wellicht de kansen kunnen verbeteren. Tevens kan op gevoelige wijze minimale stamcelziekte worden aangetoond. We hebben al enkele aanwijzingen dat dit nog beter dan minimale restziekte de toekomst van patiënten kan voorspellen. Het meest succesvol zou zijn als we op basis van specifieke celkenmerken, doelgerichte therapie zouden kunnen ontwikkelen.

Het is bekend dat het niet mogelijk is om bij alle AML patiënten een CD34+CD38-stamcelpopulatie te detecteren op de manier die beschreven is in hoofdstuk 2. Daarom hebben we in **hoofdstuk 3** een alternatieve stamcelpopulatie, zogenaamde “side population” (SP) bestudeerd, die zowel in normaal beenmerg als in AML beenmerg voorkomt. We vonden dat de SP een zeer heterogene populatie cellen is, zowel wat merker expressie als wat differentiatiegraad betreft. Verder hebben we onderzocht of dezelfde merkers die wij in hoofdstuk 2 beschreven leukemische en normale stamcellen kunnen onderscheiden. We vonden dat ook op deze stamcelpopulatie zowel CLL-1 als andere merkers aanwezig zijn. Op basis van deze kenmerken konden we dus ook binnen deze stamcelpopulatie onderscheid maken tussen leukemische en normale SP stamcellen.

De relatie tussen de CD34+CD38- en SP compartimenten is nog niet volledig bekend. Het lijkt er op dat beide compartimenten weliswaar leukemie initiërende cellen bevatten, maar dat niet alle cellen binnen dit compartiment leukemie-initiërend zijn. Daarom zal inzicht in de vermeende onderlinge relatie tussen beide

stamcelcompartimenten ons dichterbij de echte leukemie initiërende cellen kunnen brengen. We hebben in **hoofdstuk 4** gekeken naar de relatie tussen CD34+CD38- en SP compartimenten. We vonden dat deze relatie afhankelijk is van het type AML in termen van CD34 expressie: een groep van de AML patiënten had geen CD34-expressie op de kwaadaardige cellen; de zogenaamde CD34-negatieve AML. Toch blijkt in deze groep patiënten een kleine CD34-positieve populatie cellen aantoonbaar die normale voorlopercellen zijn. Wij tonen aan dat in deze patiënten het kleine compartiment CD34-positieve cellen geen CD38 tot expressie brengt normaal is en niet tot de kwaadaardige celpopulatie behoort. Toch zijn er in deze patiënten leukemische stamcellen aantoonbaar, dit bleek uit de aanwezigheid van SP cellen. Het blijkt dat deze stamcellen CD34-negatief zijn, waarbij nog niet duidelijk is of zij wel of geen CD38 tot expressie brengen.

In CD34-positieve AML hebben wij aanwijzingen dat de normale stamcellen CD34-positief zijn en geen CD38 tot expressie brengen. Terwijl de leukemische stamcellen heel verschillend antigenen tot expressie kunnen brengen; CD34+CD38-, CD34-CD38-, CD34-CD38+ en CD34+CD38+. We stellen hier een model voor waarin in vergelijking met CD34-negatieve AML, patiënten met een CD34-positieve AML chemotherapie-ongevoeligere leukemie-initiërende cellen hebben. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor het feit dat patiënten met een CD34-negatieve AML betere vooruitzichten hebben dan patiënten met een CD34-positieve AML.

In **hoofdstuk 5** hebben we de waarde van de oppervlaktekenmerken die wij in hoofdstuk 2 vaststelden als leukemie-specifiek (CLL-1 en cellijn-definiërende merkers) vergeleken met de waarde van de stamcelmerkers die zijn beschreven in de literatuur (CD33, CD44, CD47, CD96 en CD123). Met name hebben we de specificiteit onderzocht van deze merkers, dat wil zeggen als zij worden gevonden op een stamcel dan is dat een kwaadaardige stamcel en niet een normale stamcel. Hiertoe hebben we de expressie van deze merkers op de normale stamcellen binnen de CD34+CD38- en SP compartimenten bestudeerd. We laten hier zien dat CLL-1 het meest specifiek is in beide stamcelcompartimenten. Om die reden is gestart met een onderzoeksprogramma naar de therapeutische waarde van een antilichaam gericht tegen CLL-1.

De normale bloedcelvorming wordt onderhouden door dynamische interacties tussen normale stamcellen en de beenmergmicro-omgeving. Dit geldt ook voor leukemiecellen. Deze kunnen door hechting aan de beenmergmicro-omgeving

van hoge concentraties groeifactoren worden voorzien, maar wellicht belangrijker nog verminderd gevoelig worden voor chemotherapie. In **hoofdstuk 6** hebben we deze vermeende mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de overleving van AML cellen bestudeerd. We laten hier zien dat zowel met chemotherapie behandelde als onbehandelde AML cellen door stromale cellen tegen spontane en chemotherapie-geïnduceerde celdood werden beschermd. Belangrijk is dat nagenoeg niet bekend is of de schade van beenmergstroma door chemotherapie deze beschermende werking teniet zou kunnen doen. Wij vonden inderdaad een gedeeltelijk verlies van dit beschermend effect na chemotherapie behandeling van stromale cellen. Daarom kunnen we concluderen dat de uitgroei van minimale restziekte afhankelijk zou kunnen zijn van de mate van schade aan de beenmergmicro-omgeving door chemotherapie. Hoewel deze bevinding nog bevestigd moet worden voor leukemie initiërende cellen, benadrukken onze resultaten het belang van onderzoek naar de beenmergmicro-omgeving in relatie tot kwaadaardige stamcellen indien nieuwe doelwitten voor therapie worden gezocht. Dit omdat de werking van nieuwe middelen bij een intact beenmergmicro-omgeving verminderd zou kunnen zijn.

Conclusies

Kwaadaardige stamcellen spelen zowel een rol bij het ontstaan van AML als bij de uitgroei van een hernieuwde ziekte na aanvankelijk schijnbaar succesvolle behandeling. Daarom is onderzoek naar kwaadaardige stamcellen nodig. Ten eerste om deze cellen te kunnen aantonen en ten tweede om nieuwe stamcel-specifieke therapie te ontwikkelen. We hebben in dit proefschrift laten zien dat het mogelijk is om met behulp van CLL-1 en cellijn-definiërende merkers, leukemische stamcellen op elk moment vóór of tijdens de behandeling in AML patiënten aan te kunnen tonen en hiermee het ziekteverloop te kunnen voorspellen. Helaas brengen niet alle patiënten met AML deze specifieke oppervlakte kenmerken tot expressie, daarom blijft onderzoek naar nieuwe merkers noodzakelijk.

Tevens bleek dat er verschil was in de met verschillende technieken aangetoonde stamcellen (door naar CD34+, CD38- cellen te kijken versus side population cellen). Door naar de overlap te kijken, kan het compartiment van cellen waarin de stamcel zich bevindt verkleind worden en kunnen we de "echte" stamcel steeds beter definiëren. Uit dit onderzoek zijn er aanwijzingen dat er verschillen in stamcellen zijn tussen AML met en zonder expressie van CD34.

Naast voor het aantonen van kwaadaardige stamcellen kunnen deze oppervlaktekenmerken ook gebruikt worden voor de ontwikkeling van stamcelspecifieke therapie. De specifieke expressie van CLL-1 op kwaadaardige stamcellen en niet op normale stamcellen, maakt dit oppervlaktekenmerk een interessante kandidaat om antistof-gebaseerde therapie te gaan ontwikkelen. Uit onze resultaten blijkt dat het hiervoor belangrijk is om een onderscheid te kunnen maken tussen CD34-positieve en CD34-negatieve AML.

Aangezien leukemische stamcellen chemotherapie ongevoelig zijn, is het belangrijk om de beschermende rol van stromale cellen te onderzoeken. We laten hier zien dat zowel met chemotherapie behandelde als onbehandelde AML cellen door stromale cellen tegen spontane en chemotherapie-geïnduceerde celdood werden beschermd. Wij vonden tevens een gedeeltelijk verlies van dit beschermende effect na chemotherapie behandeling van stromale cellen. Zulke observaties kunnen ons helpen om de richting van toekomstige onderzoeken te bepalen; dat wil zeggen dat het onderzoek zich kan gaan richten op de beschermende mechanismen van de beenmergmicro-omgeving richting leukemische stamcellen welke tot preventie van leukemische uitgroei bij AML patiënten kan leiden.