

# VU Research Portal

## Detection and characterization of leukemic stem cells

van Rhenen, A.

2008

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

### **citation for published version (APA)**

van Rhenen, A. (2008). *Detection and characterization of leukemic 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](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# Samenvatting voor niet ingewijden



Acute myeloïde leukemie (AML) is een kwaadaardige ziekte in het beenmerg. In de Verenigde Staten treft de ziekte 3.7/100.000 mensen per jaar. De ziekte komt in gelijke mate voor bij mannen en vrouwen. Zowel kinderen als volwassenen kunnen AML krijgen en de frequentie van voorkomen neemt toe met het stijgen van de leeftijd. De meeste patiënten zijn ouder dan 65 jaar.

De precieze oorzaken voor het krijgen van AML is onbekend, al zijn er wel condities die een groter risico vormen om AML te krijgen zoals sommige aangeboren afwijkingen als Down syndroom en Fanconi anemie, en verworven beenmergziekten als myelodysplastisch syndroom en eerdere chemo- en/of radiotherapie.

Mensen die AML krijgen kunnen klachten hebben van vermoeidheid, verminderde inspanningstolerantie, blauwe plekken, bloedingen en infecties. Dat zijn allemaal symptomen die niet uitsluitend voorkomen bij AML, maar er wel goed bij passen.

De diagnose wordt gesteld aan de hand van een beenmergpunctie uit de heupkam of door middel van een bloedafname. Het beenmerg wordt onder de microscoop bekeken waarbij in het geval van AML duidelijk is dat er veel kwaadaardige cellen aanwezig zijn die de normale cellen verdringen. Die kwaadaardige cellen zijn jonge beenmergcellen (voorlopers) die nog geen functie hebben ontwikkeld en die dus nutteloos zijn. Het kwaadaardige schuilt erin dat zij niet volwassen worden en doelloos op hun beenmerg plek blijven zitten en ophopen. In de aanwezige kwaadaardige cellen wordt intensief gekeken welke eiwitten (merkers) er op de cellen zitten, en welke afwijkingen er zijn in de chromosomen (het erfelijk materiaal). Met de resultaten van deze onderzoeken stelt de hematoloog vast om welk type acute leukemie het gaat. Daarnaast dienen de onderzoeken om een inschatting te maken van de overlevingskans van een patiënt. Deze kennis wordt vervolgens gebruikt om een therapieplan op te stellen.

De therapie voor AML bestaat uit intensieve chemotherapie al of niet gecombineerd met een stamceltransplantatie. Deze behandeling vindt plaats tijdens opnames op een gespecialiseerde hematologie afdeling, omdat de risico's van de behandeling zoals het optreden van infecties en bloedingen groot zijn en het voorkomen en behandelen ervan een gespecialiseerd team van artsen en verpleegkundigen vereist. Het doel van de behandeling is het bereiken van complete remissie (CR) in het beenmerg, dat routinematig wordt afgenomen na elke kuur. Een kuur van chemotherapie duurt meestal 7 dagen en wordt gevolgd door een herstelperiode van 4 weken. Deze wordt snel gevolgd door een tweede kuur. Vervolgens wordt er een keuze gemaakt voor een autologe stamceltransplantatie waarbij stamcellen van de patiënt zelf worden teruggegeven na hoge dosis chemotherapie, een allogene stamceltransplantatie, waarbij stamcellen afkomstig zijn van een familielid of onbekende donor of een derde kuur chemotherapie. Deze keuze hangt af van het type leukemie en de risico's voor het weer terugkomen van leukemie. Het is een weging per patiënt. Na elke kuur wordt een beenmergpunctie gedaan en na de laatste behandeling wordt met enige regelmaat in het beenmerg gekeken of de ziekte definitief weg is en blijft, en de patiënt dus genezen is. Ongeveer 80% van de patiënten die jonger is dan 65 jaar bereikt een CR na de behandelingen. Toch overleeft uiteindelijk maar 30% van deze mensen met AML de ziekte en krijgen de meeste patiënten snel een recidief, wat bijna altijd het overlijden van de patiënt tot gevolg heeft. Bij de oudere patiënten zijn de resultaten veel slechter en geneest maar

10%.

Na een kuur wordt in het beenmerg gekeken of de patiënt in CR is, dat wil zeggen of, bekeken onder de microscoop, minder dan 5 van de 100 cellen kwaadaardig zijn. Dit onderzoek is niet erg nauwkeurig en een betere inschatting van het effect van de therapie kan gemaakt worden door het zoeken naar minimale restziekte ("minimal residual disease" MRD) bijvoorbeeld met behulp van flowcytometrie. Op de AML cellen bevinden zich namelijk vaak AML-specifieke merkers die aangetoond kunnen worden met behulp van antistoffen. Omdat flowcytometrie toelaat grote hoeveelheden cellen te bekijken op de samenstelling van de merkers op hun celoppervlak kan een veel preciezer inschatting gemaakt worden van de hoeveelheid restziekte die nog aanwezig is (vaak zelfs tot 1 op de 10.000 cellen). Een patiënt die na behandeling meer restziekte heeft in het beenmerg heeft meer kans om de ziekte terug te krijgen (recidief) dan een patiënt met weinig restziekte in het beenmerg.

Een belangrijk kenmerk van AML is dat de ziekte bestaat uit verschillende soorten cellen. Er is een grote groep cellen die wel deel uitmaakt van de ziekte maar deze niet kan veroorzaken en niet in stand kan houden, dit zijn de leukemische progenitoren. Daarnaast is er een heel kleine groep cellen die de oorzaak zijn van de ziekte omdat zij grote hoeveelheden leukemiecellen kunnen voortbrengen, dit zijn de leukemische stamcellen. Zij zijn weinig gevoelig voor chemotherapie en veroorzaken in veel patiënten uiteindelijk een recidief van de ziekte. Het is daarmee duidelijk dat deze cellen de belangrijkste cellen zijn als het er om gaat meer te weten te komen over het ontstaan van de ziekte en het vinden van betere behandelingen.

In dit onderzoek hebben we ons dan ook gericht op de leukemische stamcel. We wilden weten wat de mate van voorkomen (frequentie) is van de leukemische stamcellen in het beenmerg van AML patiënten. Ook wilden we weten of de hoeveelheid leukemische stamcellen bij diagnose van invloed is op het resultaat van de gegeven behandeling, met andere woorden hebben patiënten met meer stamcellen een slechtere overleving? Vervolgens wilden we weten of we leukemische stamcellen op basis van afwijkende merkers konden onderscheiden van de normale stamcellen die nodig zijn voor een normale bloedcel vorming. Dit onderscheid wilden we niet alleen bij diagnose maar ook na behandeling kunnen maken. Zo zouden we kunnen zien of patiënten die veel leukemische stamcellen hebben na behandeling, een grotere kans hebben op het terugkrijgen van de ziekte vergeleken met patiënten die minder leukemische stamcellen hebben in het beenmerg na chemotherapie. We hebben diverse merkers gevonden waaronder een die mogelijk verder ontwikkeld zou kunnen worden, niet alleen voor het opsporen van leukemische stamcellen, maar vooral voor een therapie gericht op de uitroeiing van die cellen. Daarnaast zochten we of er nog onbekende merkers op de leukemische stamcellen aanwezig zouden kunnen zijn.

In **hoofdstuk 1** geven we uitleg over de achtergronden van de normale bloedcelvorming bij de mens, over de diagnose en behandeling van AML, het opsporen van MRD en alle belangrijke bekende kenmerken van leukemische stamcellen.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we de resultaten van het bestuderen van de hoeveelheid leukemische stamcellen in AML patiënten bij diagnose. We hebben gevonden dat er een grote variatie is in de stamcelfrequentie. We vonden dat patiënten met veel stamcellen

een duidelijk slechtere overleving hebben met een grotere kans op een recidief van de ziekte in vergelijking met patiënten met een lagere hoeveelheid. We gevonden dat dit verschil komt doordat patiënten met een hogere stamcelfrequentie bij diagnose later, na de behandeling met chemotherapie, meer restziekte (MRD) in het beenmerg hebben. Eerder hadden we al gevonden dat patiënten met meer restziekte (een hogere MRD frequentie) een grotere kans hadden op een recidief van de ziekte. Concluderend kunnen we zeggen dat de hoeveelheid leukemische stamcellen een direct effect heeft op de overleving van een patiënt. Waarschijnlijk komt dit doordat leukemische stamcellen weinig gevoelig zijn voor chemotherapie. Als een patiënt dus meer leukemische stamcellen heeft, heeft hij waarschijnlijk meer cellen die minder gevoelig zijn voor chemotherapie, dan patiënten met een lagere stamcelfrequentie. Een hogere frequentie van cellen die minder gevoelig zijn voor chemotherapie leidt tot meer MRD en dus een grotere kans op een recidief.

In **hoofdstuk 3** hebben we de expressie van een eiwit, C-type lectin-like molecule-1 (CLL-1), bestudeerd op het celoppervlak van de leukemische stamcelpopulatie van een groep AML patiënten. Eerder was al gevonden dat CLL-1 een eiwit is dat zich bevindt op het celoppervlak van AML cellen. We hebben ontdekt dat CLL-1 ook aanwezig is op het oppervlak van de leukemische stamcellen en dat dit specifiek is voor leukemische stamcellen omdat de normale stamcellen geen CLL-1 hebben op hun oppervlak. In een muizenmodel hebben we kunnen aantonen dat CLL-1 echt tot expressie komt op leukemische stamcellen omdat jonge cellen met CLL-1 op het celmembraan inderdaad leukemie veroorzaakten in de muizen. Een dergelijk muizenmodel is absoluut nodig om te bewijzen dat onze zogenaamde stamcellen inderdaad in een muis leukemie kunnen veroorzaken. Als laatste konden we aantonen, door het bekijken van de CLL-1 expressie op de stamcelpopulatie, dat er patiënten zijn met veel leukemische stamcellen na chemotherapie. Deze patiënten kregen snel een terugkeer van de ziekte. Patiënten echter bij wie er geen of heel weinig leukemische stamcellen overbleven na chemotherapie, waren in bijna alle gevallen genezen van hun AML.

Omdat CLL-1 niet altijd aanwezig is op een leukemische stamcel hebben we in **hoofdstuk 4** gekeken of er nog andere leukemiespecifieke merkers aanwezig zijn op het celoppervlak. We hebben gevonden dat er naast CLL-1 nog meer merkers zijn die wel aanwezig zijn op leukemische stamcellen en niet op normale stamcellen. Zo zijn we in staat om voor een groot deel van de AML patiënten een onderscheid te maken tussen de normale en de leukemische stamcellen. Dit onderscheid valt niet alleen bij aanvang van de ziekte te maken, maar ook na behandeling van de patiënt met chemotherapie. Op deze manier zijn we in staat om in een grote groep patiënten te kijken of er na de behandeling met chemotherapie nog leukemische stamcellen over zijn. Als er nog veel leukemische stamcellen in het beenmerg aanwezig zijn is dit een aanwijzing dat de patiënt een grote kans heeft op een recidief van de ziekte.

In **hoofdstuk 5** hebben we verder gekeken of we meer te weten konden komen over de aard van de leukemische stamcel. Daarvoor hebben we deze cellen uit het beenmerg van 5 patiënten geïsoleerd. We hebben het erfelijk materiaal uit deze cellen gehaald (het RNA) en daarin de activiteit (expressie) gemeten van meer dan 30.000 genen. Dat zijn de kleine onderdelen van het totale erfelijke materiaal (DNA) van onze lichaamscellen; elk gen zorgt voor de productie van een eiwit met een specifieke functie. We hebben

de expressie van genen in de leukemische stamcellen vergeleken met de genexpressie in de leukemische progenitoren van dezelfde patiënten. We vonden dat er 247 genen verschillend tot expressie komen in leukemische stamcellen en progenitoren. Daartussen zaten een aantal genen waarvan we dat verwachten, maar ook nieuwe genen waarvan niet bekend is dat ze actief zijn in leukemische stamcellen. We hebben onze resultaten vergeleken met resultaten van anderen die gepubliceerd zijn.

In hoofdstuk 6 hebben we een alternatieve stamcelpopulatie bestudeerd die zowel in normaal beenmerg als in AML voorkomt. Omdat het niet mogelijk is om in alle AML patiënten een stamcelpopulatie te detecteren op de manier die beschreven is in hoofdstukken 2-5, zou deze stamcelpopulatie een goed alternatief zijn. We hebben ook op deze stamcelpopulatie gevonden dat zowel CLL-1 als andere merkers aanwezig zijn op de buitenkant van deze cellen. Zo valt dus ook een onderscheid te maken tussen normale en leukemische stamcellen met deze alternatieve stamcelpopulatie.

In **hoofdstuk 7** worden de algemene conclusies van dit onderzoek besproken. Daarnaast wordt er ingegaan op mogelijk toekomstig onderzoek gericht op de leukemische stamcellen.