



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Diagnostic and prognostic markers in tumor stage mycosis fungoides and Sézary syndrome

Boonk, S.E.

### Citation

Boonk, S. E. (2017, November 1). *Diagnostic and prognostic markers in tumor stage mycosis fungoides and Sézary syndrome*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/54942>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/54942>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/54942> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Boonk, S.E.

**Title:** Diagnostic and prognostic markers in tumor stage mycosis fungoides and Sézary syndrome

**Issue Date:** 2017-11-01

# 8

---

## Appendix

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Primair cutane lymfomen omvatten een heterogene groep van non-Hodgkin lymfomen die zich primair in de huid manifesteren zonder aanwijzingen voor lokalisaties elders in het lichaam. Binnen de primair cutane lymfomen zijn twee hoofdcategorieën te onderscheiden: 75% zijn primair cutane T-cel lymfomen (CTCL) en de overige 25% zijn primair cutane B-cel lymfomen (CBCL).

Mycosis fungoides (MF) en Sézary syndroom (SS) zijn de meest bekende typen CTCL. MF kent in het algemeen een indolent ziekte beloop waarbij in de loop der jaren een langzame progressie van patches naar plaques en uiteindelijk tumoren wordt gezien. SS wordt beschouwd als een leukemische variant van CTCL en heeft in het algemeen een veel slechtere prognose. SS wordt klinisch gekarakteriseerd door de trias van een diffuus rode huid (erythrodermie), gegeneraliseerd vergrote lymfeklieren en kwaadaardige T-cellen (Sézary cellen) in huid, lymfeklieren en bloed.

Een centraal onderwerp in dit proefschrift zijn de diagnostische en prognostische parameters in MF en SS.

### EVALUATIE VAN DE DIAGNOSTISCHE WAARDE VAN EERDER BESCHREVEN IMMUNOFENOTYPISCHE EN MOLECULAIRE BIOMARKERS IN SÉZARY SYNDROOM

Zeker in de vroege fase van de ziekte, is het moeilijk om een SS te onderscheiden van een erythrodermie op basis van goedaardige inflammatoire huidziekten zoals geneesmiddelenreacties, psoriasis of atopisch eczeem. De diagnostiek wordt bemoeilijkt omdat de klinische presentatie van SS en deze erythrodermie inflammatoire dermatosen (EID) sterk op elkaar kunnen lijken. Tevens wordt bij histopathologisch onderzoek van SS in eenderde van de gevallen slechts reactieve veranderingen gezien. Daarom berust de diagnose van SS met name op het aantonen van atypische T-cellen (Sézary cellen) in het bloed. Echter, vergelijkbare atypische T-cellen kunnen ook voorkomen in het bloed van patiënten met EID en worden zelfs in het bloed van gezonde personen gezien. Om te voorkomen dat patiënten met een EID ten onrechte gediagnosticeerd (en behandeld) worden als een SS, werden in 1997 diagnostische criteria voor SS vastgesteld. In de recente classificatie systemen is er sprake van SS bij een klinische presentatie van erythrodermie en gegeneraliseerde lymfadenopathie en de aanwezigheid van een T-cel kloon in het bloed, gecombineerd met één of meer van de volgende criteria: een absoluut aantal Sézary cellen van meer dan 1000 per mm<sup>3</sup>; verlies van T-cel markers CD2, CD3, CD4 en/of CD5; en/of een toegenomen absoluut CD4 aantal leidend tot een CD4/CD8 ratio gelijk of groter dan 10. Aanvullende diagnostische criteria welke in latere studies werden gesuggereerd, betreffen de aanwezigheid van ten minste 40% CD4+CD7<sup>-</sup> cellen en ten minste 30% CD4+CD26<sup>-</sup> cellen in het perifere bloed.

Een belangrijk nadeel van de huidige diagnostische criteria is het ontbreken van SS specifieke biomarkers waardoor vroege herkenning van patiënten met een SS wordt bemoeilijkt. In de afgelopen 10 jaar hebben verscheidene studies nieuwe, potentieel SS specifieke, immunofenotypische en moleculaire biomarkers beschreven. Echter zijn deze biomarkers bijna altijd in kleine, slechts in één centrum uitgevoerde studies

geïdentificeerd, met vaak een klein aantal patiënten en zijn de meeste resultaten niet bevestigd in onafhankelijke grote studies.

In **hoofdstuk 2** werd de diagnostische waarde van deze nieuwe, immunofenotypische en moleculaire biomarkers geëvalueerd in een Europese multi-centrum studie in 59 SS patiënten, gedefinieerd volgens de huidige diagnostische criteria, en 19 patiënten met een EID. Standaard werkprocedures werden gebruikt zodat alle experimenten gestandaardiseerd plaatsvonden en ook de reproduceerbaarheid van de resultaten kon worden geëvalueerd. De experimenten werden in 2 centra verricht met bijna volledig overeenkomstige resultaten. Op genetisch niveau toonden Sézary cellen een toename in het aantal gen-kopieën van *MYC* (40%), een afname in het aantal gen-kopieën van *MNT* (66%), verhoogde genexpressie van *DNM3* (75%), *TWIST1* (69%), *EPHA4* (66%) en *PLS3* (66%) en een verlaagde genexpressie van *STAT4* (91%).

De resultaten van deze studie toonden aan dat met de immunofenotypische markers CD7 (verlies van ten minste 40% van de CD4+ T-cellen) en/ of CD26 (verlies van ten minste 80% van de CD4+ T-cellen) 83% van de SS patiënten onderscheiden konden worden van de EID patiënten met 100% specificiteit. Met de combinatie van een veranderde genexpressie van de moleculaire markers *STAT4*, *TWIST1* en *DNM3* of *STAT4*, *TWIST1* en *PLS3* kon 98% van de SS patiënten onderscheiden worden van EID patiënten met 100% specificiteit. Deze twee diagnostische panels lijken waardevolle additionele criteria bij de differentiatie van SS en EID.

## PROGNOSTISCHE WAARDE VAN MOLECULAIRE BIOMARKERS IN SÉZARY SYNDROOM

Sézary patiënten hebben een slechte prognose met een ziekte-specifieke 5-jaars overleving van 24–31%. Eerdere studies hebben verscheidene prognostische parameters in SS beschreven zoals toegenomen leeftijd, kort tijdsinterval tot diagnose, verhoogde waarde van lactaat dehydrogenase (LDH) in het bloed, toegenomen aantal witte bloedcellen, hoog aantal Sézary cellen in het perifere bloed en de uitgebreidheid van lymfeklier betrokkenheid. Met gebruik van hetzelfde cohort als in **hoofdstuk 2**, werd in **hoofdstuk 3** de prognostische waarde van de moleculaire markers (*MYC*, *MNT*, *DNM3*, *TWIST1*, *EPHA4*, *PLS3* en *STAT4*) onderzocht in 64 patiënten met SS. Tevens werden de eerder beschreven prognostische parameters geanalyseerd.

De resultaten toonden een ziekte-specifieke 5-jaars overleving van 59% voor de Sézary patiënten. De analyses toonden verder dat SS patiënten met een verhoogde expressie van *PLS3* een significante betere overleving hadden. Van de klinische parameters was alleen een verhoogd aantal witte bloedcellen een significant prognostische factor.

## HISTOPATHOLOGISCHE DIFFERENTIATIE TUSSEN SÉZARY SYNDROOM EN ERYTHRODERME INFLAMMATOIRE DERMATOSEN

Het onderscheiden van SS en EID op basis van het histologische beeld is erg lastig. In **hoofdstuk 4** werd de diagnostische waarde van de eiwit markers TOX en/of C-MYC onderzocht op huidbiopten van 15 SS patiënten en 17 EID patiënten. De resultaten toonden sterke kernkleuring van TOX in meer dan 50% van de huid-infiltrerende T-cellen bij 87% van de SS patiënten, terwijl er slechts zwakke kernkleuring in minder dan 50%

van de T-cellen werd gezien bij de EID patiënten. Op basis van deze resultaten lijkt TOX expressie een goede additionele marker bij de histopathologische differentiatie tussen SS en EID. Er werd geen verschil in C-MYC aankleuring gezien tussen SS en EID patiënten.

### **DNA METHYLATIE IN SÉZARY SYNDROOM**

DNA-methylering of DNA-methylatie is een epigenetisch proces waarbij een methylgroep aan een DNA-molecuul wordt toegevoegd. DNA methylering kan een belangrijke rol spelen bij het ontstaan van kanker doordat DNA hypermethylatie van CpG eilanden in de promoter regio van een tumor suppressor gen kan leiden tot inactivatie van het betreffende gen, terwijl globale DNA hypomethylatie geassocieerd is met chromosomale instabiliteit. Eerdere studies die hebben gekeken naar DNA methylatie in SS concentreerden zich steeds op één gen. In **hoofdstuk 5** beschrijven wij de genom-brede DNA methylatie patronen van CD4+ T-cellen van 15 SS patiënten, 3 EID patiënten en 4 gezonde controles.

We vonden uitgebreide globale hypomethylatie in SS vergeleken met EID en gezonde controles. Daarnaast identificeerden we bij de SS patiënten 126 genen die significant vaker promoter hypermethylatie toonden dan de benigne controles. Van deze 126 genen werden 12 genen in deze eerste groep patiënten gevalideerd met een onafhankelijke techniek en vervolgens in een tweede onafhankelijke groep patiënten bestaande uit 20 SS patiënten en 10 EID patiënten onderzocht waarbij vergelijkbare resultaten werden gevonden. In beide groepen werd promoter hypermethylatie van *C2orf40*, *GOS2*, *HSPB6*, *PROM1*, *PAM* en *CPEB3* gezien in ten minste 90% van de SS patiënten, maar nooit bij de EID patiënten. Promoter hypermethylatie van één gen, *CMTM2*, was aanwezig in 100% van de SS patiënten en in geen van alle EID patiënten, waarmee dus nauwkeurig onderscheid met 100% sensitiviteit en specificiteit tussen SS en EID gemaakt kon worden. Dit maakt *CMTM2* een sterke kandidaat epigenetische biomarker voor SS.

De promotor hypermethylatie van *CMTM2*, *C2orf40*, *GOS2*, *HSPB6*, *PROM1*, *GNMT* en *NEXN* bij de SS patiënten was geassocieerd met een verlaagde genexpressie. Behandeling van de van een SS patiënt afkomstige SeAx cellijn met het demethyleringsmiddel 5-aza-2'-deoxycytidine resulteerde in een afname van de promoter methylatie en significant toegenomen expressie van *CMTM2*, *GOS2* en *NEXN*, wat suggereert dat deze genen epigenetisch gesilenced zijn in SS.

### **PROGNOSTISCHE WAARDE VAN HET AANTAL TUMOREN EN TUMOR RECIDIEVEN IN MYCOSIS FUNGOIDES STADIUM IIB**

MF patiënten met huidtumoren zonder extracutane lokalisaties worden geclassificeerd als een MF stadium IIB. Deze patiënten hebben een toegenomen risico op extracutane progressie en een ziekte-specifieke 5-jaars overleving van 56–80%. Hoewel alle MF patiënten met huidtumoren zonder extracutane afwijkingen worden geclassificeerd als een MF stadium IIB wordt binnen deze groep patiënten een grote variatie gezien in het aantal tumoren en het tijdsinterval tussen het ontstaan van nieuwe tumoren. Studies die de associatie tussen tumor vorming en overleving hebben onderzocht vonden dat patiënten met gegeneraliseerd huidtumoren bij de diagnose MF en patiënten waarbij sprake was van blastaire transformatie een slechtere prognose hebben. Echter de relatie

tussen overleving en het exact aantal tumoren dat zich tijdens follow-up ontwikkeld is nog niet eerder onderzocht.

Derhalve hebben wij in **hoofdstuk 6** de uitgebreidheid van tumor ontwikkeling in 46 patiënten met MF stadium IIB gekwantificeerd met behulp van een statistisch model gebaseerd op het aantal tumoren dat gedurende follow-up ontstond (inclusief het aantal tumoren ten tijde van de diagnose MF stadium IIB) en het tijdsinterval tussen elke tumor. Hiermee werd een zogenaamde “frailty score” berekend welke werd gecorreleerd met overleving. Tevens keken we of het aantal tumoren dat binnen 6 en 12 maanden ontstond na de eerste tumor voorspellend was voor de overleving.

Analyses toonde een ziekte-specifieke 5-jaars overleving van 60% voor patiënten met MF vanaf het moment van de eerste tumor (MF stadium IIB). De individuele frailty scores van de MF patiënten was significant verschillend en varieerde tussen 0.05 en 6.94. Patiënten met een hoge frailty score ( $> 1.0$ ,  $n = 14$ ) hadden een significant lagere ziekte-specifieke overleving in vergelijking met patiënten met een lage frailty score (0–0.35,  $n = 17$ ) en gemiddelde frailty score (0.35–1.0,  $n = 15$ ). Het aantal tumoren dat binnen 6 maanden na de diagnose MF stadium IIB ontstond was significant voorspellend voor de ziekte-specifieke overleving. Patiënten die vier of meer tumoren ontwikkelden binnen 6 maanden na de diagnose MF stadium IIB hadden een slechte prognose.