



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Exploring the molecular pathogenetic basis of cutaneous lymphomas

Bastidas Torres, A.N.

Citation

Bastidas Torres, A. N. (2020, November 11). *Exploring the molecular pathogenetic basis of cutaneous lymphomas*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/138190>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/138190>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138190> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Bastidas Torres, A.N.

Title: Exploring the molecular pathogenetic basis of cutaneous lymphomas

Issue Date: 2020-11-11

Appendix



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Cutane lymfomen zijn hematologische maligniteiten die in de huid aanwezig zijn zonder aanwijzingen voor extracutane ziekte op het moment van diagnose. Deze groep van neoplasieën kan worden onderverdeeld in drie categorieën: cutane T-cellymfomen (CTCL), cutane B-cellymfomen en precursor neoplasieën. In dit proefschrift worden drie CTCL-varianten, tumor-stadium mycosis fungoides (T-MF), primair cutaan anaplastisch grootcellig lymfoom (pcALCL) en primair cutaan CD8⁺ agressief epidermotroop cytotoxisch T-cellymfoom (pcAECyTCL) en één precursor neoplasie, blastisch plasmacytoïde dendritische celneoplasmie (BPDCN) geanalyseerd met behulp van hoge resolutie genoom-brede sequentiebepaling (WGS) en volledige transcriptoom sequentiebepaling (RNA-seq). Deze analyses waren met name gericht op identificering van structurele genomische veranderingen (d.w.z. veranderingen in kopie aantal (CNA's) en chromosomale herrangschikkingen), aangezien een gedetailleerd onderzoek van dit type genetische defecten in huidlymfomen in eerdere moleculaire studies nauwelijks aan de orde kwamen. De bevindingen die in dit proefschrift worden beschreven, hebben het begrip van de pathogenetische basis van deze entiteiten aanzienlijk vergroot.

In hoofdstuk 1 geven we een overzicht van de biologie van cutane lymfomen, de techniek van next-generation sequencing (NGS), principes van oncogenese en eerdere pathogenetische studies aan T-MF, pcALCL, pcAECyTCL en BPDCN. In hoofdstuk 2 bespreken we in detail de belangrijkste pathogenetische kenmerken die ontdekt zijn door NGS-studies aan de tot dusver best bestudeerde CTCL-varianten (mycosis fungoides en Sézary syndrome). Dit hoofdstuk beschrijft ook de therapeutische implicaties van deze moleculaire bevindingen.

In hoofdstuk 3 hebben we de eerste geïntegreerde (DNA/RNA) genoom-brede analyse van T-MF uitgevoerd. Om structurele genomische defecten met pathogeen potentieel te identificeren, werd een groep van 9 MF-patiënten geanalyseerd met WGS en RNA-seq. In deze studie werd het landschap van herrangschikkingen (incl. Fusietranscripten) en CNA's bij patiënten met T-MF voor het eerst gekarakteriseerd met NGS. Een vergelijkende analyse van genexpressie in T-MF en normale CD4⁺ T-cellen werd uitgevoerd om ontregelde cellulaire processen/routes in de ziekte te identificeren. De analyse bracht een aanzienlijke genoominstabiliteit aan het licht, met talrijke DNA herrangschikkingen die leiden tot verlies van DNA dat codeert voor voor tumoronderdrukkers (bijv. *ARID1A*, *CDKN2A/B*, *PTPRC*, *STK11*, enz.). Deze eiwitten zijn betrokken zijn bij signaalpaden die vaak gedereguleerd zijn in tumorcellen van MF-patiënten. De belangrijkste vinding in deze studie was de ontdekking van een terugkerende deletie van genen coderend voor *HNRNPK* en

SOCS1 in MF-tumoren (~35% als de initiële gesequentieerde en extensiecohorten gecombineerd worden), twee bekende tumoronderdrukkers die nieuw zijn voor MF-genetica. Transcriptoomanalyse liet zien dat de celcyclus, JAK-STAT, PI-3-K en ontwikkelingsroutes aberrant geactiveerd zijn.

Gezien het beperkte moleculaire inzicht dat beschikbaar is voor pcALCL, hebben we in hoofdstuk 4 de meest uitgebreide genetische studie in pcALCL tot nu toe uitgevoerd. Met behulp van een multi-platform benadering (WGS, WES, RNA-seq) onderzochten we genetische veranderingen en ontregelde genexpressie in tumoren van 12 patiënten. Deze studie bracht meerdere pathogene mutaties, CNA's en herschikkingen aan het licht die genen betreffen die betrokken zijn bij de celcyclus, regulatie van de T-celfysiologie, transcriptie en signalering via de PI-3-K-, MAPK- en G-eiwitroutes. Terugkerende gebeurtenissen die kankergerassocieerde genen aantasten, waren onder meer deletie van *PRDM1* en *TNFRSF14*, winst van *EZH2* en *TNFRSF8*, kleinschalige mutaties in *LRP1B*, *PDPK1* en *PIK3R1* en herschikkingen van *GPS2*, *LINC-PINT* en *TNK1*. PCALCL vertoonde ook een mutatiesignatuur die voornamelijk toegeschreven kan worden aan UV-straling en veroudering met geringe bijdragen van afwijkingen in dubbelstrengs breukherstel en AID-hypermutatie. Ontregelde klassieke signaalroutes werden gevonden door genexpressie in pcALCL te vergelijken met genexpressie in normale CD4⁺ T-cellen. pcALCL toonde verhoogde activatie van signaaltransductieroutes geassocieerd met de PI-3-K-, MAPK- en G-eiwitroutes (ERK, fosfolipase-C, AKT, enz.), hetgeen consistent is met de genomische gegevens. Genexpressiepatronen in pcALCL kwamen overeen met overexpressie van receptortyrosinekinasen, bijv. PDGFRB en DDR2, waarvan met onafhankelijke technieken werd bevestigd dat ze up-gereguleerd zijn in dit lymfoom.

In hoofdstuk 5 beschrijven we de eerste NGS-studie die ooit is uitgevoerd op pcAECyTCL, een van de zeldzaamste en meest agressieve varianten van CTCL. Door tumormateriaal van twaalf patiënten met WGS te analyseren, identificeerden we voor de eerste keer voor een groep bonafide oncogenen en tumoronderdrukkers met een centrale rol in de celcyclus (d.w.z. *CDKN2A/B*, *MIR34AHG*, *MYC*, *RBI*, *TP53*), chromatine-regulatie (d.w.z. *ARID1A*, *BAZ1A*, *EED*, *EPC1*, *KMT2D*, *NCOR1*, *ZEB1*) en de JAK-STAT-route (d.w.z. *JAK2*, *JAK3*, *PTPRC*, *SH2B3*, *SOCS1*, *STAT3*, *STAT5B*) dat het aantal kopieën, de sequentie-organisatie en/of de nucleotide volgorde herhaaldelijk bleken te zijn veranderd in pcAECyTCL. Opmerkelijk is dat *JAK2* en *SH2B3*, die respectievelijk de activering en beëindiging van *JAK2*-signaling in normale hematopoëtische cellen regelen, wederzijds uitsluitende veranderingen ondergingen bij negen van de twaalf patiënten uit ons cohort. Genetische veranderingen met betrekking tot *JAK2* en *SH2B3* werden gevalideerd door FISH-, ddPCR- en/of Sanger-sequencing.

Tumormateriaal van zes patiënten werd geanalyseerd met RNA-seq en de genexpressie in pcAECyTCL werd vergeleken met genexpressie in normale CD8 + T-cellen om gedereguleerde expressiesignaturen in dit lymfoom te bepalen. Opgereguleerde cellulaire processen/routes in pcAECyTCL betreffen de celcyclus (d.w.z. E2F-doelwitten, het G2/M-controlepunt, mitotische spoel), de JAK-STAT-route (via STAT3 en in mindere mate via STAT5), de TNF- α /NF-KB-route en een sterke ontstekingsreactie. Ten slotte bevestigden functionele studies dat JAK2-fusies geïdentificeerd in pcAECyTCL cytokine-onafhankelijke celoverleving induceren en dat deze activiteit met succes kan worden geblokkeerd door de FDA-goedgekeurde JAK1/2-remmer ruxolitinib.

BPDCN is al het onderwerp geweest van meerdere moleculaire studies, maar het landschap van genomische herrangschikkingen en CNAs is nooit onderzocht met NGS. In hoofdstuk 6 presenteren we de eerste genoombrede analyse van BPDCN gericht op structurele genomische defecten. Tumor DNA van tien patiënten werd geanalyseerd met WGS. Onze analyse identificeerde herrangschikkingen en verstoringen van 54 genen die voornamelijk betrokken zijn bij cytoskeletgeassocieerde processen, adhesie en transcriptionele regulatie. Deze groep omvatte genen die betrokken zijn bij hematologische maligniteiten (d.w.z. *AHL1*, *CD36*, *IKZF1*, *MLLT4*, *MYB*, *TFG*) en andere neoplasiën (d.w.z. *FAT1*, *IQGAP2*, *NRG1*, *PIK3C2G*, *PMS1*, *PPFIBP1*, *PTPRD*). We identificeerden verlies van DNA in 6 terugkerende genomische regio's coderend voor tumoronderdrukkers (d.w.z. *CDKN1B*, *ETV6*, *HNRNPK*, *IKZF1*, *RB1* en *SFRP4*) met een belangrijke rol in hematopoëse en celcyclusregulatie. Bovendien kwamen pathogene indels en SNV's in *ASXL1*, *IKZF1*, *NRAS* en *TET2* herhaaldelijk terug in ons tumormateriaal, wat in overeenstemming is met eerdere onderzoeken. Met name werd gevonden dat *IKZF1*, een gen met een cruciale rol in de vroege ontwikkeling van pDC-precursoren, focaal werd geïnactiveerd in een aanzienlijk deel van de BPDCN-gevallen (gesequentieerde en extensiecohorten gecombineerd, ~50%) als gevolg van structurele genomische defecten. Tumormateriaal van vier patiënten werd bestudeerd met RNA-seq en een vergelijkende analyse van genexpressie in BPDCN-tumoren en rustende pDC's werd uitgevoerd om ontregelde cellulaire processen/paden in dit neoplasme te detecteren. Expressiesignaturen in BPDCN kwamen overeen met bekende fysiologische gevolgen van *IKZF1*-deficiëntie (d.w.z. afwijkende adhesie, activering van PI-3-K/Akt-route) in immuun cellen. Bovendien was de expressie van geconserveerde *IKZF1*-doelwitgenen in BPDCN volledig consistent met een verlies van *IKZF1*-fenotype.

Hoofdstuk 7 vat de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift samen en bespreekt deze. Het hoofdstuk eindigt met conclusies en toekomstperspectieven.