

Chemoproteomic cell surface mapping for the detection of disease associated features in childhood acute lymphoblastic leukemia

Doctoral Thesis

Author(s):

Mirkowska, Paulina

Publication date:

2013

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009922022>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 20933

**Chemoproteomic Cell Surface Mapping for the Detection of Disease
Associated Features in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

PAULINA MIRKOWSKA

Master of Sciences,
University of Warsaw

born November 5th, 1982
citizen of Poland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Rudolf Aebersold (examiner)
Prof. Dr. Jean-Pierre Bourquin (co-examiner)
Dr. Bernd Wollscheid (co-examiner)
Dr. Beat Bornhauser (co-examiner)

2013

Summary

The treatment outcome of the patients with childhood B cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) improved substantially with the introduction of the risk directed disease management. Prediction of the relapse hazard helps to determine the intensity of applied chemotherapy and in turn to avoid under- or overtreatment. An individual *in vivo* response to treatment – assessed by the measurement of minimal residual disease (MRD, a minute level of malignant cells persisting in the bone marrow during the treatment) – has been recognized as the strongest predictor of the patients' outcome and is currently used in most of treatment protocols for stratification purposes. Despite risk informed treatment adjustment, relapses are still relatively frequent and their treatment remains challenging. Earlier recognition of the high risk patients and increased sensitivity of the MRD detection can further improve the cure rates for children with BCP-ALL.

In this PhD thesis I investigated the cell surface proteome composition of ALL cells in order to identify leukemia associated proteins for improved leukemia detection and stratification of BCP-ALL patients.

As a prerequisite for further functional studies we have established a xenograft mouse model of childhood ALL that enabled us to get an insight into the clonal composition and leukemogenic potential of the cells constituting the bulk leukemia. We determined that in childhood BCP-ALL the leukemia initiating potential is not restricted to a small subpopulation but characterizes rather a larger proportion of cells and the nature of the ALL is oligo- or even polyclonal. Consequentially, future diagnostic and treatment approaches need to consider the full diversity of ALL and targeting of the entire leukemic population must be reached.

In the subsequent projects I exploited the xenograft model as a renewable source of relevant patient material for the state-of-the-art proteomic studies. Application of complementary mass spectrometry based Cell Surface Capture (CSC) technologies allowed to establish ALL surfaceome map comprising of 713 proteins. This resource constitutes the most comprehensive description of leukemia surface proteome available to date and should serve the scientific community providing the basis for the further functional exploration of the data and investigation of the role of identified proteins in normal and malignant hematopoiesis.

In the first project I used the information from ALL surfaceome map to interrogate publicly available DMAP dataset that consist of the transcriptomic information for a 38 sorted normal hematopoietic states. Based on this cross-platform comparison we selected proteins with the

potential differential expression between leukemia and normal precursor B cells that could serve as markers for improved MRD detection. Validation of the 9 selected proteins in the independent cohort of patients showed that indeed these markers can identify ALL population at diagnosis and early MRD assessment time points and will help to distinguish malignant cells from their non-malignant counterparts. Moreover these new leukemia associated proteins allowed for the accurate quantification of malignant cells at the relevant time points used for patient stratification.

In the second project we compared the cell surface proteomes of patients from two defined risk groups. This analysis led to the identification of VNN2 as the marker linked to the adverse clinical outcome. This finding was further confirmed in independent patient cohorts. Even more importantly VNN2 high expression was shown to identify patients with a high risk of disease recurrence that are not recognized by current stratification schemes.

Taken together, this PhD thesis describes the ALL surfaceome map resource as the basis for further exploration and proposes the strategies to select clinically relevant leukemia markers that should ultimately help to improve MRD detection and stratification of leukemia patients.

Zusammenfassung

Bei der Behandlung von Kindern mit akuter lymphoblastischer B-Zell Leukämie (BCP-ALL) wurden in den letzten Jahrzehnten substanzielle Fortschritte erzielt, wofür ein Grund die Einführung von risiko-adaptierten Behandlungs-Strategien war. Eine möglichst frühe Risiko-Einteilung erlaubt es, die Chemotherapie entscheidend anzupassen, damit die Patienten entsprechend ihrer Bedürfnisse behandelt werden können. Die individuelle Antwort von Patienten auf die initiale Therapie gilt heutzutage als wichtigster prognostischer Faktor und wird in den meisten Studienprotokollen verwendet. Das Ansprechen auf Therapie wird analysiert, indem man residuale Leukämiezellen im Knochenmark quantifiziert, welche während der Therapie noch detektierbar sind (MRD Messung). Trotz den erwähnten Fortschritten erleiden immer noch viele Patienten einen Rückfall, dessen Behandlung äusserst schwierig ist. Eine frühere Erkennung von Hochrisiko-Patienten sowie eine genauere Risiko-Einteilung würden zweifellos die Heilungschancen in der Kinderleukämie verbessern. Dazu fehlt allerdings ein genaues Verständnis von spezifischen Leukämie-assoziierten Markern.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Zelloberfläche von Leukämiezellen mit massenspektrometrischen Methoden zu beschreiben, um neue Leukämie-assoziierte Marker zu identifizieren. Mit solchen neuen Markern könnte man die Detektion von Leukämiezellen während der Therapie verbessern, um den Krankheitsverlauf besser erfassen zu können und um die Risiko-Einteilung zu erleichtern.

Um die Voraussetzungen für diese proteomischen Untersuchungen bereitzustellen, nutzten wir unser etabliertes Maus-Transplantations-Modell. Humane Leukämiezellen, welche in immunsupprimierte Mäuse transplantiert wurden, rekapitulierten die Charakteristika der initialen Leukämie, sowie blieb die polyklonale Zusammensetzung der Leukämie erhalten. Wir zeigten, dass bei der BCP-ALL das Leukämie-induzierende Potential nicht auf eine kleine Subpopulation beschränkt ist, sondern einen größeren Teil der Zellen umfasst. Daraus konnten wir ableiten, dass zukünftige diagnostische und therapeutische Ansätze die Gesamtheit der leukämischen Klone angreifen müssen.

Dieses Modell wurde als erneuerbare Quelle von Leukämiezellen in den proteomischen Studien benutzt. Mit Hilfe dieses Xenograft-Modells in Kombination mit modernen Massenspektrometrie-Technologien („Cell Surface Capture Technologie“) erfassten wir die Proteine auf der Leukämie-Zelloberfläche, das „ALL Surfaceom“. Dabei wurden 713 Proteine gefunden, was die bisher grösste Sammlung von Zelloberflächenproteinen in der Leukämie

darstellt und der wissenschaftliche Gemeinde als Grundlage dienen wird für weitere funktionale Studien der normalen und malignen Hämatopoese.

In einem ersten Projekt suchten wir im ALL Surfaceom nach Proteinen, welche präferenziell auf Leukämiezellen, nicht aber auf normalen Vorläuferzellen der Hämatopoese zu finden sind und dadurch als bessere Marker für die MRD Messung dienen könnten. Der Vergleich der proteomischen Daten mit publizierten Genexpressionsprofilen (DMAP) von 38 verschiedenen Stadien der Hämatopoese identifizierte Kandidaten, mit deren Hilfe die Leukämie in Patienten besser verfolgt werden könnte. 9 Kandidaten Proteine wurden in einer unabhängigen Kohorte validiert und erlaubten eine Unterscheidung von malignen und normalen Zellpopulationen bei der Diagnose und bei frühen MRD Messungen. Darüber hinaus ermöglichten diese neuen Leukämie-assoziierten Proteine eine korrekte Quantifizierung von leukämischen Zellen an den relevanten Zeitpunkten für die Risiko-Einteilung der Patienten.

In einem zweiten Projekt verglichen wir das Surfaceom der Leukämiezellen in zwei verschiedenen Patienten-Risikogruppen. Diese Analyse identifizierte das Protein Vanin-2, dessen Expression eindeutig mit einem höheren Risiko für ein Rezidiv assoziiert war. Dieses Ergebnis wurde in einer unabhängigen Patienten Kohorte validiert. Besonders wichtig erschien, dass solche Hochrisiko-Patienten identifiziert wurden, welche mit den herkömmlichen Risiko Einteilungs-Methoden nicht erkannt wurden.

Diese Doktorarbeit beschreibt das ALL-Surfaceom als Basis für die Entwicklung und Identifikation neuer Leukämie-assoziierten Marker, welche diagnostisch genutzt werden könnten, um den Krankheitsverlauf besser abzubilden und um die Risiko-Einteilung der Patienten zu verbessern.