

Personal note

*"If I have seen further,
it is by standing on the shoulders of giants."
Isaac Newton*

Completing this PhD thesis has been a challenging journey, which would not have been possible without the help and support of several people.

Thank you to my supervisors, Frank and Kaat, for supporting and challenging me these past six years. Thank you for being critical when I lacked to be and for being optimistic when I was struggling to do so.

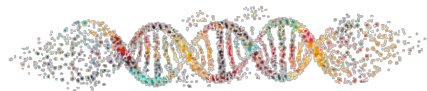
Thank you to the members of the examination committee for taking the time to read my dissertation and provide me with insightful comments to improve this work.

Thank you to all the members of the PPOL lab and CMGG in general for being the best colleagues I could have ever wished for. A special thanks to my paranymphs: Siebe, Ellen and Sarah-Lee for all the help, support, motivation, laughter, fun times, listening and reminding me that everything will be okay.

Daarnaast wil ik graag ook mijn fantastische vrienden en familie bedanken. Bedankt voor jullie onvoorwaardelijke steun tijdens dit hele avontuur, en om te zorgen voor de nodige afleiding en ontspanning. Zonder jullie waren de afgelopen zes jaar nog niet de helft zo leuk geweest.

Lieve Joachim, bedankt voor je steun, je liefde, om er te zijn. Ik kijk ernaar uit om samen met jou, Mats en Ibe, aan ons nieuw avontuur te beginnen.

Thank you all for being gene-ius!



Examination committee

Prof. dr. med. Fransiska Malfait (chairman)
Department of Biomolecular Medicine,
Ghent University (Belgium)

Prof. dr. Joni Van der Meulen
Department of Biomolecular Medicine,
Ghent University (Belgium)

Prof. dr. Patrick Sips
Department of Biomolecular Medicine,
Ghent University (Belgium)

Prof. dr. Panagiotis Ntziachristos
Department of Biomolecular Medicine,
Ghent University (Belgium)

Prof. dr. ir. Winnok De Vos
Department of Veterinary Sciences
Antwerp University (Belgium)

Prof. dr. med. Adam Durbin
Department of Oncology
St. Jude Children's Research Hospital (USA)

PhD thesis



✉ Lisa.Depestel@UGent.be



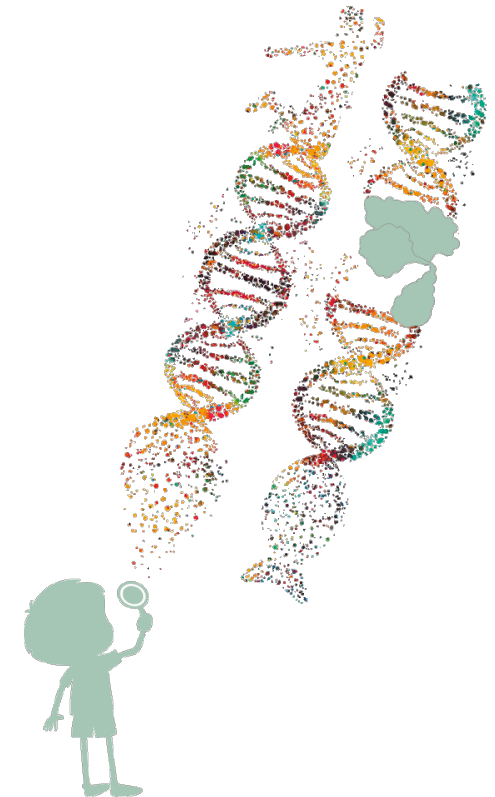
FACULTEIT GENEESKUNDE EN
GEZONDHEIDSWETENSCHAPPEN



Funding



Exploring the PHF6-RRM2 axis as a novel entry point for targeted therapy in neuroblastoma using *in vitro* and *in vivo* modeling



Lisa Depestel

Supervisors:
Prof. dr. Frank Speleman
Prof. dr. Kaat Durinck

Public PhD defense to obtain the degree
of "Doctor in Health Sciences"

September 19th, 2023

Samenvatting

Neuroblastoom is de op twee na meest voorkomende vorm van kinderkanker. Deze kanker ontstaat uit voorlopercellen van het perifere sympathisch zenuwstelsel en komt vooral voor in de bijnieren. Voor kinderen met een hoog-risico tumor liggen de overlevingskansen, ondanks de huidige, agressieve therapieën, niet hoger dan 50%. Bovendien leiden deze behandelingen vaak niet tot een volledige genezing, terwijl kinderen die wel genezen vaak last hebben van ernstige bijwerkingen. Het is dus belangrijk om nieuwe inzichten te verkrijgen in de mechanismen die bijdragen tot het ontstaan en de groei van deze kanker. Enerzijds leidt dit tot het vinden van nieuwe, efficiëntere behandelingen, en anderzijds kunnen we zo nieuwe markers identificeren die helpen bij het onderverdelen van patiënten in risicogroepen en het voorspellen of de patiënt zal reageren op een bepaalde behandeling.

Tijdens mijn doctoraat heb ik de rol van twee eiwitten, met als codenaam RRM2 en PHF6, onderzocht in neuroblastoom. Daarnaast werd een project opgestart om de neuroblastoomcellen van het zebrafishmodel op genetisch vlak te karakteriseren.

In eerste instantie werd via onderzoek op zowel cellijnen als in een zebrafishmodel, aangetoond dat RRM2 een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling en overleving van neuroblastoomcellen. RRM2 is een belangrijk eiwit voor de aanmaak van de bouwstenen van DNA. Er werden nieuwe therapieën getest die de functie van RRM2 onderdrukken. Bovendien ontdekten we dat deze behandeling de tumorcellen extra gevoelig maakt voor een ander medicijn. Dit laat toe om deze veelbelovende combinatiebehandeling in lage concentraties toe te dienen aan neuroblastoompatiënten, wat de bijwerkingen sterk kan verminderen.

In een tweede studie werd aangetoond dat PHF6 interageert met RRM2 in verschillende soorten cellen. Deze interactie is belangrijk om onder andere DNA-schade te helpen voorkomen en herstellen door het aantrekken van RRM2 naar deze regio's. Dit zorgt er namelijk voor dat er voldoende bouwstenen aanwezig zijn voor het herstel van de DNA-schade.

Het doel van het derde project was om de precieze samenstelling van neuroblastomen in het zebrafishmodel te bestuderen, alsook de genetische veranderingen tijdens de ontwikkeling van deze tumoren. We toonden onder andere aan dat de zebrafish neuroblastoomcellen een sterk gelijkende genetische achtergrond vertonen met die van humane tumoren.

Deze bevindingen kunnen de weg banen naar het ontwikkelen van nieuwe en geoptimaliseerde behandelingen, die kunnen leiden tot genezing voor de meeste, of misschien ooit zelfs alle neuroblastoompatiënten.

Summary

Neuroblastoma is the most frequent extra-cranial solid childhood tumor. This enigmatic tumor arises from immature sympathoblast progenitors of the peripheral sympathetic nervous system, including the adrenal medulla. The currently employed intensive multi-modal therapies for high-risk disease still achieve disappointingly low perspective for cure, with less than 50% survival rates. In addition, patients that do survive suffer from serious long-term side-effects, including secondary cancer later in life. As such, there is an urgent medical need for more effective and less toxic therapeutic strategies for high-risk neuroblastoma patients, with the integration of precision oncology biomarkers for patient stratification and therapy prediction and monitoring.

In this thesis, I investigated the specific function of two proteins in neuroblastoma called RRM2 and PHF6. Moreover, I initiated the genomic characterization of the previously established zebrafish neuroblastoma model.

First, we identified and functionally evaluated RRM2 as a druggable target in high-risk neuroblastoma using *in vitro* cell line cultures as well as *in vivo* zebrafish models. RRM2 is an important protein in the synthesis of the DNA building blocks and therefore important for the survival and growth of neuroblastoma cells. Next, new therapies suppressing the functions of RRM2 were tested. In addition, we found that this therapy makes neuroblastoma cells more vulnerable to treatment with another compound. This allows to treat neuroblastoma patients with very low concentrations to avoid toxicity related side-effects.

In the second study, we identified robust interactions between PHF6 and RRM2 in different cell lines. This interaction is important to help prevent and relieve DNA damage. PHF6 recognizes these regions and recruits RRM2 to provide sufficient DNA building blocks that aid in the repair of the damage.

The aim of the third research project was to study neuroblastoma tumor heterogeneity as well as the dynamic transcriptome changes during neuroblastoma formation using zebrafish models. These zebrafish neuroblastoma cells showed gene signatures highly reminiscent of human neuroblastoma which evolved as the tumors progressed. Currently, we are further unravelling the complex heterogeneity in neuroblastoma while trying to capture early genetic drivers of neuroblastoma initiation and progression.

Ultimately, these results can pave the way towards the further development of novel, more efficient and less toxic treatment protocols, which can ultimately lead to a cure for most, if not all, neuroblastoma patients.

Publications included in this thesis

RRM2 enhances MYCN driven neuroblastoma formation and acts as a synergistic target with CHK1 inhibition. [Lisa Depestel*](#), Carolina Nunes*, Liselot Mus, Kaylee M. Keller, Louis Delhay, Amber Louwagie, Muhammad Rishfi, Alex Whale, Neesha Kara, Simon R Andrews, Filemon Dela Cruz, Daoqi You, Armaan Siddiquee, Camila Takeno Cologna, Sam De Craemer, Emmy Dolman, Christoph Bartenhagen, Fanny De Vloed, Ellen Sanders, Aline Eggermont, Sarah-Lee Bekaert, Wouter Van Looche, Jan Willem Bek, Givani Dewyn, Siebe Loontjens, Gert Van Isterdael, Bieke Decaestecker, Laurentijn Tilleman, Filip Van Nieuwerburgh, Vanessa Vermeirssen, Christophe Van Neste, Bart Ghesquiere, Steven Goossens, Sven Eyckerman, Katleen De Preter, Matthias Fischer, Jon Houseley, Jan Molenaar, Bram De Wilde, Stephen S. Roberts, Kaat Durinck†, Frank Speleman†. (*shared first author, †shared last author) Science Advances (2022).

The chromatin reader PHF6 regulates replication stress and DNA damage responses through interaction with RRM2. [Lisa Depestel](#), Ellen Sanders, Sarah-Lee Bekaert, Carolien Van Damme, Aline Eggermont, Siebe Loontjens, Laurentijn Tilleman, Filip Van Nieuwerburgh, Jan Willem Bek, Louis Delhay, Pieter Van Vlierberghe, Sven Eyckerman, Kaat Durinck. Submitted to Nature Cell Biology, ID = NCB-A51039 BioRxiv (2023.03.08.531704).

Dissection of neuroblastoma tumor formation by single-cell RNA-sequencing in the MYCN driven zebrafish model. [Lisa Depestel](#), Sarah-Lee Bekaert, Noah Bonine, Celine Everaert, Volodimir Olexiuk, Siebe Loontjens, Givani Dewyn, Gert Van Isterdael, Jan Willem Bek, Niels Vandamme, Yvan Saeys, Katleen De Preter, Kaat Durinck, Frank Speleman. In preparation.

Short curriculum vitae

2012-2015

Bachelor of Science in Biomedical Sciences
Ghent University

2015-2017

Master of Science in Biomedical Sciences
Ghent University

2017-2023

Doctoral Fellow
Pediatric Precision Oncology Lab (PPOL)
Ghent University

