

VU Research Portal

Proteasome inhibitors in acute leukemia

Niewerth, D.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Niewerth, D. (2014). *Proteasome inhibitors in acute leukemia*. [, Vrije Universiteit Amsterdam].

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

SAMENVATTING - PROTEASOOMREMMERS IN ACUTE LEUKEMIE

Acute leukemie omvat ongeveer 30% van alle kanker bij kinderen. In Nederland worden ongeveer 120 kinderen per jaar met acute lymfatische leukemie (ALL) gediagnostiseerd en ongeveer 20 kinderen met acute myeloïde leukemie (AML). De overleving van kinderen met leukemie is de laatste decennia substantieel verbeterd door het gebruik van intensieve chemotherapie. Daarnaast wordt de behandeling per patiënt momenteel aangepast aan specifieke kenmerken die de prognose bepalen. Niettemin behoort een recidief na een eerdere succesvolle behandeling van leukemie tot een van de meest belangrijke problemen binnen de kinderoncologie: 20-30% van de kinderen krijgt een recidief na behandeling wat resulteert in slechts 10-40% kans op genezing voor de subtypen met een slechte prognose. Voor zowel refractaire als gerecidiveerde patiënten met een lage overlevingskans is er daarom de noodzaak tot medicijnen met nieuwe werkingsmechanismen. Een nieuw middel wat daarbij zijn effectiviteit reeds bewezen heeft, is de eerste generatie proteasoomremmer bortezomib, wat gebruikt wordt bij de behandeling van volwassenen met multipel myeloom (MM) en lymfoom. Gebaseerd op veelbelovende resultaten in de kliniek is bortezomib geselecteerd voor onderzoek als nieuwe antileukemische therapie voor kinderen met ALL en AML. Het werkingsmechanisme van bortezomib is de remming van proteasomen die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van de meeste intracellulaire eiwitten. Naast het constitutief proteasoom dat voorkomt in alle cellen, bestaat ook het immuunproteasoom dat voornamelijk tot expressie komt in cellen van het immuunsysteem en in leukemiecellen. Eiwitten die verkeerd gevouwen zijn, beschadigd zijn, en zelfs nieuw gesynthetiseerde eiwitten worden gemarkeerd voor afbraak door het binden van meerdere ubiquitine moleculen. De geubiquitineerde eiwitten worden gedirigeerd naar het proteasoom waar ze na binding door de actieve proteasoom subunits worden afgebroken. Na afbraak van de eiwitten door het proteasoom worden korte peptiden gegenereerd die gepresenteerd kunnen worden op MHC klasse I-moleculen op het celoppervlak van antigeen-presenterende cellen om een immuunrespons te initiëren, of worden verder gehydrolyseerd door aminopeptidases tot aminozuren om nieuwe eiwitten te vormen.

In dit proefschrift hebben wij de focus gelegd op de antileukemische effecten van bortezomib en tweede generatie proteasoomremmers in humane cellijnen van hematologische maligniteiten en *ex vivo* in kinderleukemie samples. Omdat resistentie tegen bortezomib vaak optreedt gedurende behandeling van MM patiënten, hebben we ook de moleculaire basis van resistentie tegen proteasoomremmers in leukemiecellen onderzocht. Gebaseerd op deze studies hebben we parameters bepaald die kunnen helpen bij de selectie van patiënten die baat hebben bij therapie met bortezomib en om strategieën te vinden om bortezomib-resistentie te voorkomen of te bestrijden.

Hoofdstuk 2 beschrijft een review over de huidige inzichten voor het gebruik van proteasoomremmers in acute leukemie. De verschillende klassen proteasoomremmers en hun klinische voor- en nadelen worden beschreven. Voortbouwend op het effect van bortezomib in MM, is bortezomib onderzocht in acute leukemie. Dit wordt beschreven in preklinische en klinische studies. Daarnaast wordt een overzicht gegeven over de combinaties van proteasoomremmer therapie met conventionele chemotherapie, met andere

proteasoomremmers, en met histon deacetylase remmers. De verschuiving van intraveneuze naar oraal toedienbare proteasoomremmers, en de afname in toxiciteit met tweede generatie proteasoomremmers draagt bij aan een verbeterde klinische toepasbaarheid. Het verbeteren van de overleving van leukemie zal voortkomen uit het verder optimaliseren van nieuwe therapieën in combinatie met andere conventionele chemotherapieën.

Ondanks de veelbelovende resultaten verkregen met bortezomib behandeling kan resistentie tegen bortezomib ontstaan wat zijn effect teniet doet. Om resistentiemechanismen in kaart te brengen hebben we modelsystemen van bortezomib-resistente hematologische tumor cellijnen gemaakt, waaronder een ALL (CCRF-CEM) een AML (THP1) en een MM (8226) cellijn. We vonden dat de belangrijkste veranderingen die ten grondslag liggen aan bortezomib-resistentie, veroorzaakt worden door mutaties in het *PSMB5* gen wat codeert voor het actieve $\beta 5$ subunit. Alle verschillende gevonden mutaties bevinden zich in de S1-pocket waar bortezomib bindt aan het proteasoom. Gebaseerd op computersimulatie modellen hebben we geconstateerd dat deze mutaties zorgen voor verminderde binding van bortezomib aan de gemuteerde $\beta 5$ -subunit van het proteasoom, wat de onderliggende basis is voor bortezomib-resistentie in leukemiecellen. Daarnaast werd het antileukemische effect van een serie tweede generatie proteasoomremmers geëvalueerd in bortezomib-resistente cellijnen. Terwijl de bortezomib-resistente cellijnen enige kruisresistentie vertoonden met de tweede generatie proteasoomremmers, waren deze cellijnen nog wel gevoelig voor de epoxyketon-gebaseerde proteasoomremmers carfilzomib, ONX 0912 en ONX 0914. De bortezomib-resistente cellijnen waren echter even gevoelig voor de $\alpha 7$ -subunit remmer 5AHQ als de bortezomib-gevoelige cellijnen.

Het ontstaan van resistentie tegen bortezomib en de veelvoorkomende bijeffecten zoals perifere neuropathie, hebben bijgedragen aan de ontwikkeling van tweede generatie proteasoomremmers met irreversibele in plaats van reversibele binding aan het proteasoom, betere farmacokinetiek en een geoptimaliseerde therapeutische index. In **hoofdstuk 4-5** worden *in vitro* studies beschreven die de antileukemische effecten van twee tweede generatie proteasoomremmers onderzoeken in leukemie cellijnen, en daarnaast worden de resistentiemechanismen tegen deze medicijnen in kaart gebracht na langdurige blootstelling aan bortezomib. Selectieve remming van het immuunproteasoom heeft veel aandacht gekregen op basis van hun effect in immuunziekten en inflammatoire aandoeningen. **Hoofdstuk 4** toont het antileukemische effect aan van de immuunproteasoomremmer PR-924 en de mechanismen van verworven resistentie tegen PR-924 in hematologische tumor cellijnen. PR-924 heeft antileukemische activiteit, zelfs in bortezomib-resistente cellen, maar om dat te bewerkstelligen is complementaire remming van zowel de $\beta 5i$ als $\beta 5$ subunits noodzakelijk. CCRF-CEM (T-ALL) cellen met verworven resistentie tegen PR-924 werden gekenmerkt door een Met45Ile mutatie in het *PSMB5* gen, en daarnaast verhoogde expressie van de constitutieve proteasoom subunits en verlaagde expressie van immuunproteasoom subunits. Dit onderstreept dat de $\beta 5$ subunit van essentieel belang is in verworven resistentie tegen proteasoomremmers, zelfs voor proteasoomremmers specifiek voor het immuunproteasoom.

Hoofdstuk 5 toont het antileukemische effect aan van proteasoomremmer salinosporamide A (Marizomib, NPI-0052), dat wordt geproduceerd door marine actinobacterie *Salinispora tropica*, en onderzoekt de mechanismen van verworven resistentie tegen dit medicijn in CCRF-

CEM (T-ALL) cellen. In tegenstelling tot andere proteasoomremmers remt salinosporamide A alle drie de katalytische activiteiten van het proteasoom. Salinosporamide A liet een significant antileukemisch effect zien in lage concentraties en was synergistisch met bortezomib in bortezomib-resistente cellen. CEM cellen met 5-voudig verworven resistentie tegen salinosporamide A waren kruisresistent tegen bortezomib. Opmerkelijk genoeg waren de mutaties in de salinosporamide A-resistente cellen vergelijkbaar met de mutaties in *Salinispora tropica*, wat wijst op een evolutionair geconserveerd resistentie mechanisme.

Dus, leukemiecellen met verworven resistentie tegen bortezomib, PR-924, of salinosporamide A hebben dezelfde overlappende moleculaire resistentie mechanismen, namelijk puntmutaties in de constitutieve $\beta 5$ subunit. Daarnaast waren de katalytische constitutieve proteasoom activiteiten en subunit expressie verhoogd vergeleken met gevoelige cellen, terwijl immuunproteasoom expressie en katalytische activiteit voornamelijk verlaagd waren.

Vanwege de veranderde proteasoom samenstelling van bortezomib-resistente tumorcellen, werd het effect van interferon- γ op constitutieve en immuunproteasoom homeostase onderzocht in drie verschillende bortezomib-resistente tumor cellijnen (**hoofdstuk 6**). Bortezomib-resistente cellen die een verlaagde immuunproteasoom expressie en verhoogde constitutief proteasoom expressie hadden, vergeleken met bortezomib-gevoelige cellen, werden blootgesteld aan interferon- γ . Deze behandeling verhoogde de expressie van het katalytisch actieve immuunproteasoom in bortezomib-resistente cellen met in parallel verlaagde expressie van zowel de gemuteerde als ongemuteerde allelen van constitutief $\beta 5$. Deze eigenschappen resulteerden in verhoogde gevoeligheid van bortezomib-resistente cellen voor bortezomib, en meest prominent voor de immuunproteasoomremmer ONX 0914. Dit sensitiserend effect werd tenietgedaand door siRNA remming van $\beta 5$ maar niet door $\beta 1$ remming, wat indiceert dat de $\beta 5$ subunit een belangrijke factor is in resistentie tegen bortezomib.

Om te verifiëren of deze *in vitro* bepaalde parameters ook klinisch relevant zijn hebben we de proteasoom subunit expressie bepaald in *ex vivo* ALL en AML patiënten cellen afgenomen bij initiële diagnose (**hoofdstuk 7**). We hebben laten zien dat de proteasoom compositie van leukemiecellen voornamelijk bestaat uit immuunproteasomen. Daarnaast hebben ALL cellen een hogere immuunproteasoom expressie dan AML cellen, terwijl totale proteasoom hoeveelheid niet verschilt tussen deze twee typen leukemie. ALL cellen waren *ex vivo* gevoeliger dan AML cellen voor proteasoomremmers bortezomib, carfilzomib, ONX 0912 (oprozomib), ONX 0914, 5AHQ en het glucocorticoïd dexamethason. Omdat een goede respons op glucocorticoïden in kinderen met ALL een gunstige prognostische factor is, was het interessant om te zien dat het farmacologische effect van dexamethason werd versterkt in combinatie met bortezomib, resulterende in additieve of synergistische effecten. Na classificatie in subgroepen waren de prognostisch ongunstige pro-B ALL en T-ALL groepen even gevoelig voor bortezomib als de pre-B/common ALL groep. Correlaties tussen proteasoom subunit expressie en gevoeligheid voor proteasoom remming onthulde dat ratio's van immuun-/constitutieve proteasoom subunits significant correleerde met de gevoeligheid voor proteasoomremmers in kinder-ALL en -AML cellen.

In **hoofdstuk 8** hebben we onderzocht of ratio's van immuun-/constitutief proteasoom subunits correleren met klinische respons op bortezomib in refractaire kinderen of

kinderen met een eerste recidief van acute leukemie. Patiënten waren geïncubeerd in twee Children's Oncology Group (COG) fase 2 klinische studies van bortezomib met reïnductie chemotherapie voor kinder-ALL (COG-AALLP107) en kinder-AML (COG-AAML07P1). Eiwitexpressie van proteasoomsubunits verkregen voorafgaand aan de reïnductie chemotherapie liet zien dat ratio's van $\beta 5i/\beta 5$ en $\beta 1i/\beta 1$ significant hoger waren in ALL cellen dan in AML cellen. Patiënten die een complete remissie (CR) bereikten na reïnductie therapie hadden significant hogere $\beta 5i/\beta 5$ en $\beta 1i/\beta 1$ ratio's vergeleken met patiënten die geen CR bereikten. Naast eiwitexpressie ratio's werden ook verhoogde $\beta 5i/\beta 5$ ratio's van proteasoom subunit-specifieke katalytische activiteit gezien voorafgaand aan behandeling in patiënten die een CR behaalden vergeleken met degenen die dat niet bereikten. Samengevat indiceren deze resultaten dat hogere immuun-/constitutief proteasoom ratio's vóór behandeling in acute leukemie kan dienen als een voorspellende factor voor een goede klinische respons op bortezomib-gebaseerde therapie.

Alhoewel de kinderleukemiecellen die gebruikt zijn in dit proefschrift verschillende intrinsieke gevoeligheid voor proteasoomremmers hadden, werden er geen mutaties gevonden in de $\beta 5$ subunits van het proteasoom. De meeste patiëntencellen waren afgenomen voorafgaand aan behandeling of na de eerste behandelcyclus van drie weken. Aangezien alle $\beta 5$ mutaties gevonden in humane cellijnen verworven werden na langdurige blootstelling aan bortezomib, zal het ontwikkelen van mutaties rationeel gezien langer duren. Wel is door deze en andere studies gevonden dat de verhoogde $\beta 5$ subunit expressie als primair reactiemechanisme op bortezomib kan resulteren in *in vivo* resistentie. Ook bij onze cellijnen ging dit vooraf aan het mogelijk later verkrijgen van mutaties die pas geïnduceerd werden als gevolg van langdurige blootstelling aan bortezomib.

In conclusie, bortezomib en tweede generatie proteasoomremmers zijn goede kandidaten voor implementatie in de behandeling van acute leukemie bij kinderen. In het bijzonder zijn de nieuwe oraal beschikbare tweede generatie proteasoomremmers zeer interessant. De resultaten van dit proefschrift zijn van belang voor de toekomstige behandeling van kinderleukemie met name voor het voorkomen van de toxiciteit van bortezomib, het omzeilen van bortezomib-resistentie en verdere evaluatie van hun synergie in combinatie met andere medicijnen zoals glucocorticoiden. Betreffende mechanismen van bortezomib-resistentie impliceren de resultaten die hier beschreven zijn dat leukemiepatiënten met hogere immuunproteasoom expressie en lagere constitutief proteasoom expressie voorafgaand aan behandeling met bortezomib beter zullen reageren op bortezomib-gebaseerde therapie dan patiënten met hogere constitutief proteasoom expressie. Om vast te stellen of de immuun-/constitutief proteasoom ratio een bepalende factor is voor de gevoeligheid voor proteasoomremmers verdient nader en prospectief onderzoek in grotere patiënten cohorten.

KERNPUNTEN

1. Gebaseerd op preklinische data blijken combinaties van bortezomib met conventionele chemotherapie en daarnaast de ontwikkeling van tweede generatie proteasoomremmers veelbelovende behandelingsopties voor kinderen met

(refractaire en gerecidiveerde) acute leukemie.

2. Het stapsgewijs verhogen van de bortezomib concentratie in cellijnen van hematologische origine resulteert in verworven resistentie veroorzaakt door verhoogde constitutief proteasoom subunit expressie en inductie van puntmutaties in het *PSMB5* gen, leidend tot verminderde binding van bortezomib.
3. Immuunproteasoom remmer PR-924 remt specifiek de $\beta 5i$ subunit, echter dit resulteert alleen in een antileukemisch effect als zowel immuunproteasoom subunit $\beta 5i$ als constitutieve subunit $\beta 5$ worden geremd.
4. Leukemiecellen zijn gevoelig voor de natuurlijk geproduceerde proteasoomremmer salinosporamide A (Marizomib, NPI-0052) en salinosporamide A is synergistisch met dexamethason in bortezomib-resistente cellen, waardoor het een potentieel interessante behandelingsoptie is voor ALL.
5. Verworven resistentie tegen tweede generatie proteasoomremmers, zelfs een immuunproteasoomremmer, wordt veroorzaakt door een mutatie in het *PSMB5* gen. Dit onderstreept het belang van de $\beta 5$ subunit voor het antileukemische effect van proteasoomremmers.
6. Identieke mutaties in salinosporamide A-resistente *in vitro* gegenereerde ALL cellen en tevens in de *Salinispora tropica* actinobacterie wijzen op een evolutionair-geconserveerd resistentie mechanisme.
7. Hogere ratio's van immuun-/constitutief proteasoomlevels in kinderleukemie cellen voorafgaand aan behandeling kunnen van voorspellende waarde zijn voor verhoogde klinische gevoeligheid voor bortezomib-gebaseerde behandeling.