

VU Research Portal

Alternative splicing in acute leukemia-relevance in treatment response

Wojtuszkiewicz, A.M.

2016

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Wojtuszkiewicz, A. M. (2016). *Alternative splicing in acute leukemia-relevance in treatment response*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, 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

Introductie

Kanker is een overkoepelende term die gebruikt wordt voor meer dan 100 verschillende ziektebeelden, allemaal gekenmerkt door een abnormale cel groei, die kan ontstaan in vele verschillende weefsels. De normale groei van cellen in ons lichaam is een proces dat strikt gereguleerd wordt. Kanker cellen hebben echter een manier gevonden om hier aan te ontsnappen en kunnen daardoor ongecontroleerd gaan delen. Deze ongeremde deling leidt tot het overgroeien van het normale weefsel door de kanker (of maligne) cel.

Een bepaald type kanker in witte bloedcellen is acute lymfatische leukemie (ALL) die ontstaat in het beenmerg waar onrijpe lymfocyten ophopen die niet meer uit differentiëren naar functionele cellen en ongeremd delen. Hierdoor worden de normale cellen overgroeid en zijn er geen functionele lymfocyten meer waardoor onder andere het immuunsysteem aangedaan raakt. Van alle kinderen onder de 15 jaar die gediagnosticeerd worden met kanker heeft 25% ALL, waarbij de piek ligt in de leeftijdsgroep van 2 tot 3 jaar. Het resultaat van de behandeling van ALL is in de afgelopen decennia sterk verbeterd, momenteel is de 5-jaars overleving 85%.^{1,2} Desondanks krijgt 20% van de ALL patiënten onder de 18 uiteindelijk een relapse, waarna de prognose zeer slecht is. Het feit dat therapie resistentie het voornaamste obstakel is voor effectieve behandeling is een belangrijke motivatie voor verder onderzoek naar de onderliggende mechanismen van deze resistentie

Van pre-mRNA splicing, een van de essentiële stappen in de translatie van DNA naar functionele eiwitten, is recent beschreven dat het van belang kan zijn bij geneesmiddelen resistentie en zelfs ook bij de pathogenese van hematologische maligniteiten.^{3,4} Daarom hebben we voor dit proefschrift onderzoek gedaan naar de relevantie van alternatieve splicing in acute leukemie, zowel naar de rol die het speelt in therapie resistentie als naar nieuwe behandelingen die gebaseerd zijn op het remmen van het spliceosoom, de complexe machinerie, bestaand uit RNA en eiwitten, die splicing katalyseert.

Pre-mRNA splicing in kanker

Naar pre-mRNA splicing is relatief weinig onderzoek gedaan, niet naar de mechanismen maar ook niet naar de rol die het speelt in kanker. De afgelopen jaren zien we een stijgend aantal publicaties die beide onderwerpen behandelt. In **hoofdstuk 2** worden de moleculaire mechanismen achter splicing en de huidige ontwikkelingen ten aanzien van afwijkende splicing in de pathogenese en prognose van kanker alsook de spliceosome gerichte therapie uitvoerig behandeld. We bespreken de nieuwe mutaties, recent geïdentificeerd in kanker, die invloed hebben op de verschillende componenten van de splicing machinerie, met inbegrip van SFB1 en U2AF1. Bovendien wordt in dit hoofdstuk aandacht gegeven aan het potentiële gebruik van splicing als target voor de verbetering van therapie tegen kanker en in het bijzonder van hematologische maligniteiten. Daarnaast wordt de bijdrage van afwijkende splicing in chemoresistentie besproken waarbij gekeken is naar genen betrokken bij metabolisme van geneesmiddelen en apoptose regulatie. Hoewel de rol van splicing in apoptose regulatie goed beschreven is, is onduidelijk hoe dit precies leidt tot chemoresistentie in leukemie. Bovendien is van verscheidene genen betrokken bij het metabolisme in ALL en een andere acuut leukemie subtype - acute myeloïde leukemie (AML) - beschreven dat er foutieve splicing plaats vindt, resulterend in verlaagde activiteit van chemotherapeutica.⁵⁻⁷ Zo is foutieve splicing

1

2

3

4

5

6

7

8

9

&

1 van folylpolyglutamaat synthetase (FPGS) geassocieerd met methotrexaat (MTX) resistentie in ALL
 2 bij volwassenen.⁸ MTX- een folaat antagonist- blijft een belangrijke pijler van de behandeling van
 3 ALL, die gebruikt wordt bij relapse in het centraal zenuwstelsel en bij onderhoudstherapie^{1,2}. De
 4 effectiviteit is in hoge mate afhankelijk van de activiteit van FPGS- het enzym dat polyglutaminatie
 (het achtereenvolgens toevoegen van glutamaat residuen) van MTX katalyseert waardoor de
 intracellulaire retentie en het vermogen om het doelwit enzym te remmen verhoogd wordt. MTX is
 bewezen van groot belang in de behandeling van ALL en verdere karakterisatie van de mechanismen
 die leiden tot resistentie tegen deze drug zou de overleving van ALL patiënten kunnen verbeteren.

5 **MTX resistentie en foutieve FPGS splicing**

6 Alhoewel veel moleculaire mechanismen van MTX resistentie in ALL gedegen *in vitro* gekarakteriseerd
 7 zijn, is de klinische relevantie vaak onduidelijk. In **hoofdstuk 3** hebben we de grondslag voor MTX
 8 resistentie onderzocht in een groep van 235 ALL patiënten in de kinderleeftijd, waarvan de klinische
 data en de lange termijn follow-up bekend waren. In de geanalyseerde samples, afgenomen ten
 tijde van diagnose, werd gekeken naar parameters die de potentie hebben om MTX resistentie
 te veroorzaken, zoals MTX-polyglutamaat levels in leukemische cellen, MTX sensitiviteit, gemeten
 door te kijken naar een van de target enzymen thymidylate synthetase (TS), en de katalytische
 activiteit van FPGS.

9 Daarnaast is gekeken naar de mRNA expressie van een aantal enzymen betrokken bij (anti)
 folaat metabolisme (FPGS; TS; gamma-glutamyl hydrolase (FPGH); dihydrofolaat reductase (DHFR))
 & en transport (reduced folate carrier (RFC)). In overeenstemming met eerdere rapportages liet
 onze analyse een sterke correlatie zien van ophoping van grote hoeveelheden MTX met lange
 polyglutamaat ketens in de leukemische blast met een langere overleving in ALL patiënten. Dit
 was eender voor de totale accumulatie van gepolyglutamyleerd MTX en FPGS katalytische activiteit.
 Daarbij was FPGS activiteit de meest prominente determinant van MTX resistentie (gedefinieerd door
 TS inhibitie assay-TSIA) in deze studie, wat het belang in de klinische setting nog eens benadrukt.

Recent is aangetoond dat verstoorde splicing van FPGS waarschijnlijk bijdraagt aan MTX
 resistentie in ALL patienten.⁸ In **hoofdstuk 4** evalueerden we de profielen van afwijkingen in
 splicing van het FPGS gen in zowel volwassen- als kinder-ALL, en onderzochten de impact ervan
 op FPGS functie en MTX resistentie, met behulp van een *in vitro* cellijn model. Het optreden van
 FPGS splicing veranderingen werd eerst onderzocht in een initiële reeks ALL patiënten middels
 een op PCR gebaseerde assay die de volledige reeks FPGS transcripten omvat. Deze uitgebreide
 splice variant screening liet een veelheid aan splicing veranderingen in het FPGS gen in kinder
 ALL patienten samples zien, die de verwachtingen ver overtrof. De impact van afwijkingen in
 splicing van FPGS op FPGS functie werd onderzocht middels een 3D eiwitmodel en middels een
 FPGS activiteits assay. Daarnaast werd bepaald of FPGS splicing veranderde door behandeling
 met MTX en andere chemotherapeutica. Deze analyses lieten zien dat het merendeel van de FPGS
 splicevarianten resulteerden in verstoorde FPGS functie. De meest prominente FPGS splice variant
 bij alle onderzochte monsters was intron 8 partiele retentie (intron 8 PR). Deze FPGS splice variant
 werd vooral gemoduleerd in de humane FPGS-deficiënte MTX-resistente T-ALL cellijn - CCRF-CEM/
 R30dm na blootstelling aan MTX. Dit zou kunnen betekenen dat dynamische veranderingen in FPGS
 splicing leiden tot resistentie tegen stress situaties geïnduceerd door antifolaten.

Om onze bevindingen te bevestigen in een *ex vivo* setting bepaalden we vervolgens de FPGS splicing veranderingen in een grotere groep ALL patiënten (91 patiënten). Hierbij bestudeerden we de associatie met MTX resistentie en de response van de patiënt op de behandeling. De FPGS splicing veranderingen werden semi-kwantitatief bepaald middels PCR gecombineerd met fragment analyse. (**hoofdstuk 5**) Daarnaast werd de sensitiviteit van dit patiënten materiaal voor andere drugs getest met de MTT assay. Omdat veel genen in de cel dezelfde splicing regulatoren delen, hebben we onszelf de vraag gesteld of foutieve FPGS splicing een indicatie is voor een algemener onderliggend defect in de splicing machinerie, dat mogelijk resulteert in multi drug resistentie. Intron 8 PR bleek ook de meest relevante FPGS splice variant in de FPGS splicing screen van het cohort kinder ALL patiënten, conform onze eerdere *in vitro* data. In een subgroep van patiënten met een suboptimale concentratie van MTX polyglutamaten was een hoog niveau van FPGS intron 8 PR voorspellend voor slechtere overleving. De relatie tussen FPGS intron 8 PR en overleving bleef significant in een analyse met meerdere variabelen, waaronder bekende prognostische factoren zoals witte bloed cel , ALL subtype en leeftijd. In deze subgroep van patiënten correleert een hoog niveau van FPGS intron 8 PR met hoge MTX resistentie (bepaald middels TSIA assay), en lagere accumulatie van lange keten MTX polyglutamaat. Bovendien werd een hoog level intron 8 PR ook geassocieerd met resistentie tegen glucocorticoiden. Opmerkelijk genoeg, vonden we dat een MTX-resistente FPGS-deficiënte sublijn van CEM/R30dm een hoog niveau van intron 8 PR heeft en tegelijkertijd een opmerkelijk hoge dexamethason (Dex) cross-resistentie (350-voudig). Deze bevindingen suggereren dat afwijkende FPGS splicing deel uitmaakt van een algemener fenomeen dat het gevolg is van defecten in de splicing machinerie dat meerdere genen beïnvloedt. Deze hypothese vraagt om verder onderzoek en impliceert dat patiënten die drug resistent blijken te zijn door afwijkende splicing, mogelijk baat hebben bij therapeutische strategieën waarbij splicing gemoduleerd wordt.

Potentieel van splicing gerichte therapieën

Er bestaan verschillende splicing gerichte therapieën , waaronder strategieën waarbij gebruik wordt gemaakt van target specifieke oligonucleotiden maar ook algemene spliceosoom inhibitie door gebruik te maken van specifieke remmers. Voor deze laatste categorie heeft veel onderzoek zich gericht op SF3B1 (een van de subunits van het spliceosoom). Specifieke remmers van SF3B1 laten veelbelovende resultaten zien in solide tumoren en in chronische lymfoïde leukemie (CLL).⁹⁻¹² Op basis van deze waarnemingen hebben we eerst gekeken of pre-mRNA splicing ook in kinder acute leukemie een geschikt doelwit is voor therapie. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van de nieuwe spliceosoom remmers – pladienloide B (PB) en meayamycin B (MAMB). De respons van leukemische cellijnen op beide middelen werd bepaald met een MTT assay. Zowel ALL als AML cellijnen reageerden op opmerkelijk lage (laag nanomolair) concentraties PB en MAMB. De geconstateerde groeiremming was geassocieerd met het tot stilstand komen van de celcyclus in G1 en G2/M fase zowel als apoptose inductie met bijbehorende splicing veranderingen in verschillende apoptose-gerelateerde genen, waaronder MCL-1 en BCL-X. Interessant is dat zelfs leukemische sublijnen die resistent zijn tegen verschillende conventionele chemotherapeutica, met inbegrip van MTX, Dex, bortezomib en imatinib, gevoelig bleven voor SF3B1-remmers. In overeenstemming met onze *in vitro* leukemie cellijn modellen, bleken zowel primaire ALL als AML cellen opmerkelijke gevoeligheid te zijn voor PB en MAMB in de MTT assay, terwijl de niet maligne



1

2

3

4

5

6

7

8

9

&

cellen geïsoleerd uit het BM van gezonde kinderen, significant minder gevoelig waren (alhoewel nog steeds in de nanomolaire range). Deze bevindingen suggereren dat van SF3B1 remmers verder moet worden onderzocht of ze een nieuwe therapeutische optie zijn voor patiënten die resistent zijn voor de drugs waarmee ze behandeld worden. Onze resultaten suggereren dat remming van het spliceosome de MCL-1 afhankelijke Dex resistentie bij ALL patiënten zou kunnen sensibiliseren, zoals gesuggereerd wordt door het synergistische effect van beide drugs op Dex-resistente cellijnen. De in vitro bevindingen zouden moeten worden bevestigd in muis-modellen, waarbij men ook alert moet blijven op de mogelijke toxiciteit voor normale weefsels. Bovendien zou in vivo modulatie van apoptose gerelateerde splicing profielen door SF3B1 remmers, grondig moeten worden geëvalueerd, omdat van expressie en splicing van apoptose factoren eerder aangetoond is dat ze worden beïnvloed door de tumor micro-omgeving.

Alternatieve splicing in intercellulaire communicatie

Apoptose resistentie van AML cellen bij diagnose is geassocieerd met ziekte vrije overleving van AML patiënten en eerder werd aangetoond dat dit wordt beïnvloed door factoren uit de micro omgeving, waaronder cytokines. Wij hebben aangetoond (**hoofdstuk 7**) dat er een correlatie is tussen de blasten en de normale lymfocyten van een AML patiënt in de expressie van apoptose gerelateerde eiwitten, inclusief de anti-apoptotische eiwitten BCL-2, MCL-1L en BCL-XL en pro-apoptotisch BAX.. Apoptose resistente cellen waren in staat om de expressie van anti-apoptotisch BCL2 te verhogen in apoptose sensitieve cellen door ze samen te kweken (contact-kweek). Om inzicht te krijgen in de mogelijke mediators van apoptose resistentie, hebben we diepgaande proteoom profiling uitgevoerd van zowel het gehele secretoom als van de gezuiverde extracellulaire vesikels (EVs) geproduceerd door apoptose resistente of apoptose sensitieve AML cellen. Tot onze verbazing zagen we dat, binnen de eiwitten die differentieel tot expressie komen bij apoptose resistente AML cellen, het belangrijkste functionele eiwit cluster; dat van de regulering van pre-mRNA splicing is. Interessant daarbij is dat pre-mRNA splicing factoren ook differentieel tot expressie komen in exosomen uitgescheiden door apoptose resistente primaire AML blasten wanneer we deze vergeleken met exosomen uitgescheiden door apoptose sensitieve primaire AML blasten. Deze bevindingen suggereren dat apoptose resistente AML cellen exosomen waarin eiwitten zitten die betrokken zijn bij pre-mRNA splicing uitscheiden, waardoor overdracht plaatsvindt van het resistente profiel aan naburige apoptose-gevoelige cellen. Dit denkbeeld wordt ondersteund door confocal imaging analyses die de opname van EVs geproduceerd door apoptose resistente AML cellen, in apoptose sensitieve cellen laten zien. Het effect van dit proces op de apoptose resistentie van de ontvangende cellen moet nog worden bepaald. Het ontstaan van drug resistentie in AML door de overdracht van eiwit netwerken die betrokken zijn bij algehele modulering van gen expressie middels vesikels, is een intrigerend concept dat zou kunnen leiden tot de ontdekking van nieuwe bio-markers van apoptose of drug resistentie, die in het bloed van AML-patiënten zouden kunnen worden opgespoord.

Conclusie

Tezamen geven de resultaten aan dat afwijkende splicing een uiterst belangrijk fenomeen is voor verscheidene aspecten van leukemie behandeling. Alternatieve splicing, waaronder FPGS splice

varianten, heeft een impact op drug resistentie en op de respons van leukemische cellen op therapie. Het brede spectrum van splicing profielen indicatief voor resistentie vereist verdere karakterisering in ALL en AML cellen met als doel deze informatie te gebruiken bij de monitoring van de respons op geneesmiddelen. Verder inzicht in deze processen zou kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen gericht tegen defecten in splicing of gericht op het moduleren van splicing, teneinde resistente ziekte weer gevoelig te maken voor de therapie.

Belangrijkste punten

- Afwijkingen in pre-mRNA splicing dragen bij aan de pathogenese en geneesmiddelen resistentie van hematologische maligniteiten, waaronder acute leukemie.
- Intracellulaire concentraties van methotrexaat (MTX) lange keten polyglutamaten en de activiteit van folypolyglutamaat synthetase (FPGS) zijn de sleutelfactoren voor betere overleving van acute lymfocyttaire leukemie (ALL) bij kinderen.
- Afwijkingen in FPGS splicing komen veelvuldig voor in ALL en leiden tot onwerkzame transcripten of eiwitten zonder functionele activiteit.
- Intron 8 partiële retentie van FPGS is gerelateerd aan zowel slechter behandelingsresultaat in kinder ALL patiënten met een verminderde accumulatie van gepolyglutamyleerd MTX, als aan dexamethason resistentie, hetgeen een defect in splicing suggereert dat verder reikt dan FPGS alleen.
- Spliceosoom inhibitie heeft potentieel als een nieuwe therapie voor patiënten met (geneesmiddel resistente) ALL en acute myeloïde leukemie (AML), alhoewel de mogelijke toxiciteit voor de normale beenmerg cellen verder onderzoek behoeft.
- Apoptose resistente primaire AML cellen scheiden exosomen uit die regulatoire eiwit netwerken bevatten, waaronder splicing factoren, die opgenomen kunnen worden en mogelijk apoptose resistentie induceren in primaire apoptose gevoelige cellen.

REFERENTIES

1. Pui C-H, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **2006**;354:166–78.
2. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling M V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* **2012**;120:1165–74.
3. Rossi D, Brusca G, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, Fangazio M, Vaisitti T, Monti S, Chiaretti S, Guarini A, Del Giudice I, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* **2011**;118:6904–8.
4. Hou H, Liu C, Kuo Y, Chou W. Splicing factor mutations predict poor prognosis in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **2016**; Published online Jan 24.
5. Wojtuszkiewicz A, Assaraf YG, Maas M, Kaspers G, Jansen G, Cloos J. Pre-mRNA splicing in cancer: the relevance in oncogenesis, treatment and drug resistance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2015**;11:673–89.
6. Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* **2011**;286:3177–84.
7. Stark M, Bram EE, Akerman M, Mandel-Gutfreund Y, Assaraf YG. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1/H2-dependent unsplicing of thymidine phosphorylase results in anticancer drug resistance. *J Biol Chem* **2011**;286:3741–54.
8. Stark M, Wichman C, Avivi I, Assaraf YG. Aberrant splicing of folypolyglutamate synthetase as a novel

1

2

3

4

5

6

7

8

9

&

1

2

3

4

5

6

7

8

9

&

mechanism of antifolate resistance in leukemia. *Blood* **2009**;113:4362–9.

9. Larrayoz M, Blakemore SJ, Dobson RC, Blunt MD, Rose-Zerilli MJJ, Walewska R, Duncombe A, Oscier D, Koide K, Forconi F, Packham G, Yoshida M, et al. The SF3B1 inhibitor spliceostatin A (SSA) elicits apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia cells through downregulation of Mcl-1. *Leukemia* **2015**;1–28.
10. Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Rosich L, Montraveta A, Roldan J, Rodriguez V, Villamor N,

Aymerich M, Lagisetti C, Webb TR, Lopez-Otin C, Campo E, et al. The splicing modulator sudemycin induces a specific antitumor response and cooperates with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **2015**;6:22734–49.

11. Gao Y, Koide K. Chemical perturbation of Mcl-1 pre-mRNA splicing to induce apoptosis in cancer cells. *ACS Chem Biol* **2013**;8:895–900.
12. Gao Y, Trivedi S, Ferris RL, Koide K. Regulation of HPV16 E6 and MCL1 by SF3B1 inhibitor in head and neck cancer cells. *Sci Rep* **2014**;4:6098.