

# VU Research Portal

## Molecular mechanisms of bortezomib resistance in acute leukemia

Franke, N.E.

2017

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

### **citation for published version (APA)**

Franke, N. E. (2017). *Molecular mechanisms of bortezomib resistance in acute leukemia*. [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](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

In dit proefschrift zijn de mogelijke toepassing van het nieuwe geneesmiddel bortezomib (BTZ) in leukemie onderzocht. In **hoofdstuk 1** worden de genetische achtergrond van leukemie, behandelopties, redenen voor falen van de huidige therapie en lange termijn gevolgen besproken. Deze ziekte wordt veroorzaakt door ongecontroleerde overmatige deling van witte bloedcellen in het beenmerg waardoor de andere gezonde cellen in het beenmerg (rode bloedcellen, bloedplaatjes en gezonde witte bloedcellen) verdrukt worden en niet meer aangemaakt kunnen worden. Patiënten presenteren zich daarom vaak met klachten van veel blauwe plekken door verlaagd aantal bloedplaatjes, moeheid door bloedarmoede en infectie als het gevolg van gebrek aan gezonde witte bloedcellen. Leukemie is de meest voorkomende vorm van kinderkanker en kan worden onderverdeeld in Acute Lymfatische Leukemie (ALL) en Acute Myeloïde Leukemie (AML). Ook bij volwassenen komt leukemie voor, echter vormt dit een veel kleiner percentage van alle kankervormen op de volwassen leeftijd.

De kans op genezing van ALL is bij kinderen vrij groot, de overlevingskans is ongeveer 83-94%. Op de volwassen leeftijd zijn de overlevingskansen veel slechter, slechts 15-35% van de patiënten overleeft de ziekte. Hetzelfde verschil is te zien bij AML, van alle kinderen die de ziekte krijgen, overleeft 65-70% terwijl dat bij volwassen patiënten maar tussen de 10-45% ligt (afhankelijk van de leeftijd).

De behandeling bestaat momenteel uit een combinatie van verschillende chemokuren. Ondanks deze zeer agressieve behandeling komt de ziekte na het voltooien van de chemotherapie nog bij een behoorlijk grote groep weer terug. Daarnaast hebben de patiënten, die wel genezen door de behandeling, op de lange termijn vaak nog bijwerkingen van de chemotherapie. Daarom zijn nieuwe therapieën noodzakelijk die de overlevingskansen van leukemie patiënten verbeteren en minder bijwerkingen hebben op zowel de korte als ook de langere termijn.

In **hoofdstuk 2** wordt de ratio beschreven achter de remming van het proteasoom met bortezomib in de behandeling van leukemie. BTZ is de eerste uit de familie van de proteasoomremmers, een groep geneesmiddelen die de eiwitafbraak in de cel remt. In elke cel van het lichaam worden continu eiwitten aangemaakt. Deze eiwitten zijn één van de bouwstenen van de cel en voeren allerlei taken uit binnen de cel. Het DNA van de cel is de blauwdruk voor alle eiwitten in de cel. Indien een bepaald eiwit geproduceerd moet worden, wordt de DNA code gekopieerd in RNA. Dit RNA wordt uit de kern van de cel naar de plek getransporteerd waar het eiwit wordt geproduceerd. Onderweg kan de productie van dat eiwit nog beïnvloed worden doordat een microRNA zich bindt aan het RNA, waardoor deze niet gelezen kan worden. Dit complexe evenwicht bepaalt welke eiwitten gemaakt worden en daarmee wat er in de cel gebeurt.

Op het moment dat een eiwit versleten is of er tijdens de productie van het eiwit een fout wordt gemaakt, zal deze worden afgebroken door een voor eiwitafbraak verantwoordelijk eiwit complex, het proteasoom. Het geteste middel BTZ remt de eiwit afbraak, waardoor er een overschot ontstaat aan niet functionerende eiwitten, die in hoge concentraties giftig zijn voor een cel. Aangezien kankercellen snel delen en veel eiwit produceren, ontstaan er tevens veel misvormde eiwitten. Veel kankercellen zijn dus meer afhankelijk van de werking van het proteasoom dan gezonde cellen.

Het proteasoom is samengesteld uit twee verschillende grote onderdelen, de kap en de centrale cilinder. De kap herkent versleten en misvormde eiwitten doordat er een markeringsketen aan vast zit, ubiquitine. Vervolgens wordt door het cilindervormige middenstuk, het versleten of misvormde eiwit geknipt in kleine stukken, peptiden. Het middenstuk is opgebouwd uit 4 ringen. Deze ringen bestaan op hun beurt weer uit kleinere onderdelen, subunits. De 2 buitenste ringen zijn opgebouwd uit zeven subunits, de 2 binnenste ringen uit zeven subunits. Drie van deze subunits, de 1, 2 en 5, zijn verantwoordelijk voor het daadwerkelijke knippen van het af te breken eiwit. De daaruit ontstane peptiden kunnen verder worden afgebroken tot aminozuren, welke weer gebruikt worden om nieuwe eiwitten te fabriceren. Dit beschreven afbraakmechanisme is verantwoordelijk voor ongeveer 80% van alle eiwitafbraak in de cel. Naast deze standaard vorm, bestaat er ook nog een immuun proteasoom wat voornamelijk in afweer cellen wordt geproduceerd. Deze vorm van het proteasoom bevat de 1i, 2i en 5i subunits in plaats van de 1, 2 en 5 subunits die in het standaard proteasoom zijn ingebouwd.

Wanneer het proteasoom wordt geremd, zullen misvormde eiwitten ophopen in een cel wat in hoge concentraties dodelijk is voor de cel. Daarnaast remt dit de 5 en de 1 activiteit met als gevolg een blokkade in de afbraak van eiwitten. Kankercellen waaronder leukemiecellen delen sneller dan gezonde cellen waardoor er continu meer eiwitten aangemaakt worden met als gevolg ook meer misvormde eiwitten. Daardoor zijn kankercellen gevoeliger voor proteasoomremming dan gezonde cellen. In **hoofdstuk 2** worden tevens een overzicht gegeven van originele laboratorium onderzoeken en vervolgens de klinische studies met BTZ.

In het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, is onderzocht of BTZ en nieuwere proteasoomremmers effectief waren, wanneer leukemiecellen van kinderen in het laboratorium werden blootgesteld aan deze nieuwe therapieën. Aangezien BTZ reeds bij volwassen patiënten met de ziekte van Kahler, ook Multipel Myeloom (MM) genoemd, gebruikt werd en in deze groep ook patiënten ongevoelig waren voor deze nieuwe therapie, hebben wij een BTZ ongevoelig leukemie model ontwikkeld. Dit model werd gebruikt om het mechanisme van ongevoeligheid, resistentie genaamd, te ontrafelen. Vervolgens werd met behulp van dit mechanisme, gezocht naar mogelijkheden om aan te tonen c.q. te voorspellen of patiënten op BTZ gaan reageren.

In **hoofdstuk 3** wordt besproken hoe effectief BTZ is vergeleken met drie 2e generatie proteasoomremmers, wanneer deze getest werden op leukemiecellen afkomstig van het beenmerg van kinderen met leukemie. Getest zijn carfilzomib, de oraal beschikbare variant ONX 0912 en de immuunproteasoomremmer ONX 0914. Daarbij werd tevens onderzocht wanneer BTZ gecombineerd met dexamethason samen beter werkten als de afzonderlijke middelen (additief effect) of elkaar nog verder versterkten waarbij het effect van de combinatie meer is als het effect van beide middelen bij elkaar opgeteld (synergistisch effect).

Als eerste bleek, dat ALL cellen 5.5 keer zo gevoelig zijn voor proteasoomremmers dan AML cellen ( $P < 0.001$ ). De combinatie van BTZ en dexamethason was additief tot synergistisch in het merendeel van de patiënten samples. Vervolgens werd gekeken of de hoeveelheid en de verhouding van de verschillende subunits van het proteasoom samen hing met de gevoeligheid voor proteasoomremmers. Daaruit bleek dat een toegenomen ratio van  $\beta 5i/\beta 5$ ,  $\beta 1i/\beta 1$  en  $\beta 2i/\beta 2$  correleerde met de gevoeligheid voor proteasoomremmers. Deze data suggereerden dat de verhouding en de absolute hoeveelheid van de subunits kunnen bijdragen aan ongevoeligheid voor proteasoomremmers.

Vervolgens werden bortezomib ongevoelige cellijnen ontwikkeld, door steeds de concentratie van bortezomib in het kweekmedium stapsgewijs te verhogen. Gebruikt werden de THP-1 cellijn als AML model (**Hoofdstuk 4**), de CCRF-CEM cellijn als ALL model en RPMI-8226 als MM cellijn (**Hoofdstuk 5**). Als eerste werd gekeken naar de gevoeligheid van de BTZ ongevoelige cellijnen voor andere chemotherapeutische middelen. Daaruit kwam naar voren dat deze ongevoelige cellijnen nog volledig gevoelig waren voor de standaard chemotherapie, echter wel resistent waren voor andere proteasoomremmers. Toen vervolgens werd gekeken naar de 5 subunit, het primaire aangrijpingspunt van BTZ, werd een sterk verhoogde hoeveelheid waargenomen met als gevolg een sterk verlaagd  $\beta 5i/\beta 5$  ratio. Tevens werd een kleine verandering, een mutatie, waargenomen in het DNA van deze specifieke subunit. Deze mutatie lag precies in de regio die codeert voor de locatie waar BTZ bindt aan de  $\beta 5$  subunit. Ook in de andere cellijnen werden deze mutaties waargenomen. In dit hoofdstuk wordt door middel van een computer model onderzocht wat het precieze effect van de mutatie is op de uiteindelijk binding van BTZ. Middels deze modelering werd aangetoond dat de gevonden mutaties resulteerden in subtiele veranderingen precies op de plek waar BTZ bindt. Hoewel deze veranderingen klein waren, hadden ze allen direct of indirect effect op de binding en daarmee de effectiviteit van BTZ. Naast BTZ werd ook gekeken naar het effect op de normale functie van de  $\beta 5$  unit, het afbreken van eiwitten. Daaruit bleek dat de test stof LLVY-AMC, die een indicatie kan geven over de normale  $\beta 5$  functie, ook minder goed bond aan de  $\beta 5$  unit. Dit laatste resultaat verklaarde waarom de  $\beta 5$  subunit in zulke hoge hoeveelheden aanwezig was in de BTZ ongevoelige cellen. Door de mutatie kan BTZ

slechter binden aan de  $\beta 5$  subunit, echter door de mutatie is deze tevens minder goed in staat zijn normale functie uit te voeren. De reactie van ongevoelige cellijnen daarop is verhoogde productie van de  $\beta 5$  subunit ter compensatie.

Tot slot is in **hoofdstuk 6** middels een screening op DNA, mRNA en miRNA niveau in de CCRF-CEM cellijn, onderzocht of naast de mutaties nog aanvullende mechanismen een rol spelen in de resistentie voor BTZ. Uit deze screening bleek dat de ongevoelige cellijnen veel minder stress door misvormde eiwitten ondervonden van BTZ als de gevoelige cellen. Daarnaast werd gevonden dat het eiwit genaamd MARCKS in grote hoeveelheden aanwezig was in de BTZ ongevoelige cellen. Deze overproductie werd ook gezien in leukemiecellen van veel patiënten die niet goed reageerden op een combinatie therapie waar BTZ deel vanuit maakte, echter was deze overproductie niet significant meer dan de patiënten die wel reageerden op de therapie ( $p=0.073$ ). Vervolgens werd in de ongevoelige cellijn een associatie aangetoond tussen MARCKS en het ontstaan van ubiquitine gevulde vesikels in de cel. Deze vesikels werden uitgescheiden en opgenomen in omliggende cellen. Vanuit deze data postuleren wij een nieuw BTZ resistentie mechanisme: via uitscheiding van vesikels gevuld met ubiquitine gebonden misvormde eiwitten, wordt het geremde proteasoom omzeild en zal geen stress optreden in BTZ ongevoelige cellen. Daarnaast is MARCKS potentieel marker voor BTZ mechanisme.

Samenvattend (**Hoofdstuk 7**) wordt in dit proefschrift getoond dat proteasoomremmers potentieel effectief kunnen zijn in de behandeling van leukemie. Daarnaast wordt aangetoond dat langdurige blootstelling aan BTZ in het laboratorium leidt tot ongevoeligheid. Deze resistentie is enerzijds te verklaren door mutatie in het  $\beta 5$  gen tezamen met verhoogde productie van dit eiwit met als gevolg minder remming van de  $\beta 5$  subunit door BTZ. Anderzijds kunnen de gevolgen van  $\beta 5$  remming worden vermindert door ubiquitine gebonden eiwit uit te scheiden middels vesikels, waarmee het proteasoom omzeild wordt. Verder werd MARCKS geïdentificeerd als mogelijke voorspeller van het aanslaan van BTZ therapie. Aanvullend preklinisch onderzoek in combinatie met klinische studies zijn noodzakelijk om verdere voorspellers van response op proteasoomremmers te kunnen identificeren en bevestigen. Verder blijkt uit de huidige studie dat langdurige blootstelling aan proteasoomremmers resulteert in therapie resistentie. Om de overleving van patiënten met leukemie te verbeteren, zullen proteasoomremmer moeten worden gecombineerd met andere vormen van chemotherapie. Lopende en toekomstige klinische studies zullen het antwoord moeten geven welke combinatie hiervan het meest effectief is.