

University of Groningen

Signal transduction pathways involved in proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia blasts

Birkenkamp, Kim Ute

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2001

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Birkenkamp, K. U. (2001). *Signal transduction pathways involved in proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia blasts*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

Signalen van buitenaf worden door een cel ontvangen en vervolgens binnenin de cel verwerkt (de signaal transductie routes), wat uiteindelijk leidt tot een adequate cellulaire respons. In kankercellen blijkt deze signaal transductie vaak verstoord te zijn. Dit proefschrift beschrijft dan ook de rol en regulatie van verschillende signaaltransductie routes bij de celdeling en geprogrammeerde celdood van bloedkanker cellen.

De bloedcelvorming (Hematopoïese)

Bloedcellen worden gevormd uit een klein aantal primitieve stamcellen in het beenmerg. De meest belangrijke eigenschap van deze stamcellen is dat ze zichzelf kunnen vernieuwen. Dit garandeert een voorraad van stamcellen die de bloedcelvorming (hematopoïese) gedurende het hele leven kan handhaven. De stamcellen rijpen vervolgens uit tot verschillende soorten volwassen bloedcellen met verschillende functies: de witte bloedcellen (leukocyten; afweer tegen ziekteverwekkers), rode bloedcellen (erythrocyten; transport van zuurstof) en bloedplaatjes (trombocyten; verantwoordelijk voor de bloedstolling). De meest volwassen bloedcellen hebben een beperkte levensduur en worden daarom ook continu geproduceerd in het beenmerg.

Het hematopoïetische systeem moet in staat zijn om zich aan te passen aan plotselinge veranderingen in de behoefte aan verschillende bloedcellen. Bijvoorbeeld bij een bacteriële infectie zijn veel granulocyten en monocyten nodig om de infectie te bestrijden. Deze snel veranderende behoeftes aan verschillende soorten bloedcellen vraagt om controle mechanismen die heel zorgvuldig de celdeling en uitrijping van de hematopoïetische cellen reguleren. Een sleutelrol bij deze processen spelen de groeifactoren en interleukines. Dit zijn boodschappermoleculen die door verschillende bloedcellen geproduceerd worden en uitgescheiden en aan het oppervlak van andere cellen kunnen binden. Deze groeifactoren kunnen de cellen aanzetten om te delen, om uit te rijpen of zijn simpelweg nodig voor de cel om te kunnen overleven.

Acute myeloïde leukemie (AML)

Acute myeloïde leukemie is een vorm van bloedkanker. Het wordt veroorzaakt doordat een bloedcel in plaats van uit te rijpen tot een volwassen bloedcel, als onrijpe cel blijft bestaan. Deze onrijpe cel kan ongecontroleerd gaan delen. Na verloop van tijd ontstaat er een grote ophoping van deze onrijpe bloedcellen in het beenmerg, die nauwelijks functioneel zijn. De abnormale, maligne bloedcellen zijn in een enorme overmaat aanwezig zodat zij de productie van normale bloedcellen in het beenmerg verstoren. Acute leukemie geeft aan dat er in een korte tijd een woekering van onrijpe bloedcellen plaatsvindt. Afhankelijk van het type bloedcel dat ongeremd deelt en van het stadium waarop de cel is ontspoord wordt acute myeloïde leukemie onderverdeeld in 7 verschillende groepen, AML-M1 tot en met AML-M7 (zie ook figuur 1, op pagina

11 van dit proefschrift).

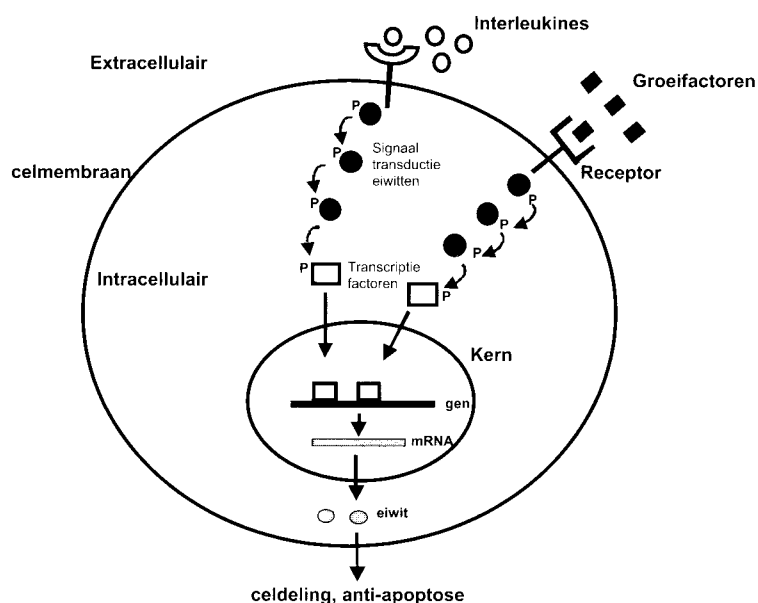
AML cellen zijn voor hun overleving, groei en deling partieel afhankelijk van groeifactoren en interleukines, die geproduceerd worden door andere cellen in het beenmerg en bloed. Maar in ongeveer 30% van de patiënten produceren de AML cellen zelf ook spontaan deze groeifactoren. Hierdoor zijn ze niet afhankelijk van andere cellen en bovendien versterken ze hun eigen celdeling, groei en overleving. Dit wordt autocriene stimulatie genoemd. De uitgescheiden groeifactoren kunnen cellen in de directe omgeving aanzetten tot celdeling maar ook tot productie van groeifactoren. Dit wordt paracriene stimulatie genoemd. Het blijkt dat AML patiënten waarvan de cellen autocriene groei vertonen *in vitro* een veel geringere overlevingskans hebben na behandeling met chemotherapie dan patiënten waarvan de cellen *in vitro* geen autocriene groei vertonen.

Wanneer hematopoietische cellen worden onttrokken aan groeifactoren gaan ze dood. Maar ook andere factoren kunnen celdood induceren, zoals stress van cellen (UV licht, hoge zout concentraties) en natuurlijk cytostatica. Binnen in de cel worden er dan nauwkeurig gereguleerde mechanismen aangezet die tot geprogrammeerde celdood (apoptose) leiden. Het is beschreven dat AML cellen die autocriene groei vertonen niet in apoptose gaan wanneer deze gedurende lange tijd gekweekt worden zonder toevoegingen van exogene factoren, terwijl AML cellen zonder autocriene groei snel dood gaan. Hoogstwaarschijnlijk is dit één van de verklaringen voor de slechte overlevingskans van die patiënten waarvan de cellen autocriene groei *in vitro* vertonen. Deze cellen worden beschermd en gaan niet in apoptose. Behandeling met chemotherapeutica leidt tot apoptose van tumorcellen. Het blijkt dat de algemene gevoeligheid van een tumorcel om in apoptose te gaan mede bepalend is voor het succes van een behandeling met cytotoxische geneesmiddelen.

Signaal transductie

De aanwezigheid van een groeifactor of cytokine buiten de cel wordt waargenomen door receptoren. Dit zijn eiwitten die door de celmembraan heen steken en aan de buitenkant (extracellulair) het boodschappermolecuul aan zich binden. Als reactie op die binding van een boodschappermolecuul, wordt door de receptor een signaal naar de binnenkant (intracellulair) doorgegeven. Cytokine receptoren kunnen dezelfde maar ook verschillende eiwitten activeren en de tijd van activatie kan verschillen. Afhankelijk van deze factoren kan een specifieke cellulaire respons ontstaan, een cel kan bijvoorbeeld gaan delen, differentieren of gewoon overleven. Wanneer een groeifactor aan zijn receptor bindt leidt dit tot de activatie van een hele cascade van elkaar activerende eiwitten (signaal transductie routes) binnen in de cel (fig.1).

De activatie van de eiwitten in deze cascade gebeurt door fosforylatie. Dit betekent dat een eiwit (een kinase) een fosfaatgroep aan een ander eiwit kan hangen waardoor dat eiwit vervolgens actief wordt. De signaal transductie routes die geactiveerd worden en het uiteindelijke effect op de cel zijn sterk afhankelijk van het soort boodschapper molecuul en het celtipe. De geactiveerde signaal transductie routes leiden uiteindelijk



Figuur 1: Schematisch overzicht van signaal transductie routes geactiveerd door boodschapper moleculen.

Wanneer een groeifactor of interleukine bindt aan zijn specifieke receptor op het celoppervlak leidt dit tot de activatie van signaal transductie eiwitten binnen in de cel. Deze eiwitten worden geactiveerd door fosforylatie (P). Het ene eiwit geeft het signaal door aan het andere eiwit totdat uiteindelijk een transcriptie factor wordt geactiveerd. Deze verplaatst zich dan naar de kern, alwaar hij aan een specifieke plaats op een gen kan binden. De binding van een transcriptie factor aan een gen resulteert in afschrijving van het gen, de zogenaamde transcriptie. Er wordt vervolgens messenger RNA (mRNA) gemaakt. Dit mRNA wordt dan afgelezen om er een eiwit van te maken. De eiwitten die gemaakt zijn spelen een rol bij talrijke cellulaire processen.

tot de activatie van transcriptie factoren. Dit zijn eiwitten die aan DNA kunnen binden en vervolgens de transcriptie van genen, betrokken bij celdeling of bescherming tegen celdood, kunnen induceren. Vele van deze transcriptie factoren worden ook door fosforylatie geactiveerd.

Dit proefschrift

In veel AML cellen blijkt een aantal van deze signaal transductie routes spontaan geactiveerd te zijn. Daarom is het van groot belang om te bestuderen welke specifieke routes in AML cellen een rol spelen bij de celdeling en bij de bescherming tegen apoptose. Deze studies kunnen uiteindelijk een bijdrage leveren aan de opheldering van de verschillende factoren die betrokken zijn bij de ongecontroleerde celdeling en resistentie tegen apoptose en mogelijkwjs leiden tot nieuwe therapie-strategieën tegen kanker.

Hoofdstuk 1 is een algemene inleiding over de verschillende signaal transductie

routes.

In **hoofdstuk 2** is beschreven dat de p38 en ERK signaal transductie routes betrokken zijn bij de interleukine-1 (IL-1) en interleukine-3 (IL-3) geïnduceerde celdeling van AML cellen. Dit werd onderzocht met behulp van specifieke remmers voor p38 en ERK. De p38 route is gedeeltelijke betrokken bij de activatie van de transcriptie factor STAT5, waarvan beschreven is dat dit eiwit een rol speelt bij proliferatie. Bovendien is aangetoond dat de p38 en ERK routes ook een belangrijke rol spelen bij de cytokine productie. Dit werd bepaald door het effect van de specifieke remmers op de IL-1-geïnduceerde IL-6 secretie, een van de autocrine groeifactoren die door AML cellen wordt uitgescheiden, te bepalen. Belangwekkend is dat ondanks dat IL-1 en IL-3 beide de p38 en ERK routes activeren, alleen IL-1 in staat is om IL-6 secretie te induceren. Dit komt doordat IL-3 niet in staat is om de transcriptie factor NF-kappaB te activeren, een van de belangrijkste eiwitten die betrokken zijn bij de regulatie van de IL-6 productie. Concluderend kan gesteld worden dat zowel de p38 als de ERK route een belangrijke rol spelen bij de celdeling en IL-6 secretie van AML cellen, die afhankelijk zijn van de geactiveerde cytokine receptoren.

In **hoofdstuk drie** is gekeken naar de rol van een andere signaal transductie route, de PI3-kinase en p70S6 kinase route, bij de IL-1-gemedieerde celdeling en cytokine productie van normale en leukemische cellen. Het bleek dat de functie van de PI3-kinase route sterk afhangt van de rijpingsgraad van de AML cellen. In hele jonge cellen werd de IL-1-geïnduceerde celdeling sterk geremd door specifieke remmers voor de PI3-K en p70S6 kinase, zonder een effect op de IL-6 secretie. Terwijl in rijpe monocyttaire cellen remming van de PI3-kinase route een sterk verhogend effect had op de IL-6 secretie. Deze effecten werden niet alleen in de leukemische cellen, maar ook in normale gezonde cellen waargenomen. Het bleek dat de remming van de PI3-kinase route gepaard ging met een verhoging van de cyclisch AMP productie, een molecuul waarvan beschreven is dat het de IL-6 secretie kan verhogen. Alhoewel de verhoogde IL-6 secretie afhankelijk is van cyclisch AMP bleek dit niet via de bekende effector moleculen protein kinase A of Rap1 te verlopen. Deze resultaten laten zien dat de remming van de PI3-kinase route een remmend effect heeft op de celdeling, maar een sterk verhogend effect op de IL-6 secretie afhankelijk van het uitrijpingsstadium van de cel.

De transcriptie factor NF-kappaB speelt een belangrijke rol bij de regulatie van de IL-6 gen expressie. Daarom werd in **hoofdstuk vier** gekeken of de p38 signaal transductie route een rol speelt bij de activatie van NF-kappaB. Een leukemische cellijn werd blootgesteld aan de remmer SB203580, een stofje dat specifiek de p38 signaal transductie route remt. Het bleek dat SB203580 geen effect had op de activatie van NF-kappaB. Belangwekkend was dat wanneer er hoge concentraties van SB203580 werden toegediend, de activiteit van NF-kappaB zelfs sterk toenam. De experimenten lieten verder zien dat hoge concentraties van SB203580 de ERK en JNK routes activeerden. De ERK route bleek uiteindelijk verantwoordelijk te zijn voor de activering van NF-kappaB. Deze resultaten laten dus zien dat er duidelijk een "cross-talk" bestaat tussen de verschillende signaal transductie routes.

CHAPTER 8

De activatie van de ERK route wordt meestal geassocieerd met celdeling en uitrijping van cellen, terwijl activatie van de JNK/p38 route niet alleen een rol speelt bij de cel activatie maar ook bij de celdood. In **hoofdstuk vijf** is gekeken naar de dubbele rol van de JNK en p38 routes bij de celdood en celactivatie van een leukemische cellijn. Wanneer cellen onttrokken werden aan hun groeifactoren leidde dit tot celdood, wat gepaard ging met een verhoogde activiteit van JNK en p38 en directe remming van de ERK route. Verhoogde activiteit van p38 en JNK werd ook waargenomen wanneer de cellen werden geactiveerd met IL-1. Maar de toevoeging van IL-1 zorgde er juist voor dat de cellen bleven overleven. In dit geval ging de verhoogde activiteit van JNK en p38 gepaard met een verhoogde ERK activiteit. Dat p38 een belangrijke rol speelt bij de celdood werd bewezen doordat de specifieke remmer SB203580 de celdood remde. Een specifieke remmer van de ERK route, PD98059, deed daarentegen het beschermende effect van SB303580 en IL-1 teniet. Dit wijst erop dat het beschermende effect van SB203580 en IL-1 een resultaat is van een verschuiving in de balans tussen de ERK en p38/JNK routes. Verder bleek dat de IL-1 en SB203580-gemedieerde effecten gepaard gingen met een verhoogde activiteit van de transcriptiefactoren NF-kappaB en AP-1, die op hun beurt ook geremd konden worden door PD98059. Deze resultaten tonen aan dat de p38 route een dubbele functie heeft, waarbij andere factoren zoals ERK, AP-1 en NF-kappaB hoogstwaarschijnlijk bepalen wat de uiteindelijke reactie van een cel is.

Cytokines en groeifactoren activeren een familie van transcriptie factoren die de STATs (signal transducer and activator of transcription) worden genoemd. De spontane activatie van een aantal leden van deze familie, STAT1, 3 en 5, komt in AML cellen voor. Maar tot nu toe is het exacte mechanisme dat verantwoordelijk is voor deze spontane activatie niet opgehelderd. In **hoofdstuk zes** is daarom gekeken welke mechanismen verantwoordelijk zijn voor de spontane STAT5 activatie in AML cellen. In 18 van 26 AML patiënten werd spontane activatie van STAT5 gevonden. Het bleek dat in de meerderheid van de gevallen de spontane STAT5 activatie gepaard ging met spontane activatie van de Flt3 receptor. Deze receptor speelt een belangrijke rol bij de celdeling en overleving van hematopoietische voorloper cellen. Bovendien is er beschreven dat specifieke mutaties in deze receptor kunnen voorkomen in AML cellen. De resultaten van ons onderzoek laten zien dat de meerderheid van de onderzochte STAT5 positieve AMLs spontane Flt3 activatie vertoonden en dat dit gepaard ging met mutaties in de receptor. Een deel van de onderzochte AMLs vertoonden echter spontane Flt3 activiteit, terwijl de receptor geen mutatie had. Daarnaast werd er in de minderheid van de gevallen spontane STAT5 activiteit gevonden, die werd veroorzaakt door de productie van autocriene groeifactoren.

Alle AMLs die hoge spontane STAT5 en Flt3 activiteit hadden vertoonden over het algemeen een veel lager percentage aan spontane celdood, vergeleken met de AMLs die geen spontane fosforylatie van STAT5 hadden. Toevoeging van een specifieke remmer voor de Flt3 receptor resulteerde in een sterke remming van de STAT5 activiteit en een verhoging van de spontane celdood.

Deze data laten zien dat in de meerderheid van de gevallen spontane STAT5 activiteit

NEDERLANDSE SAMENVATTING

wordt veroorzaakt door spontane Flt3 activiteit samenhangend met mutaties in de receptor. Dit is geassocieerd met een laag percentage van spontane celdood van deze AML cellen.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft een bijdrage geleverd aan de opheldering van de signaal transductie routes die betrokken zijn bij de celdeling, cytokine secretie en celdood van AML cellen. Uit dit onderzoek blijkt dat farmacologische remmers van specifieke signaaltransductie routes weliswaar een sterk remmend effect hebben op de proliferatie van AML cellen, maar ook een averechts kunnen hebben op andere functies van de cel zoals een verhoogde IL-6 secretie. Hierdoor lenen deze remmers zich niet als potentiële anti-kanker geneesmiddelen. De complexiteit van de signaal transductie routes, de onderlinge interacties en de balans tussen de verschillende routes stelt de cel in staat om op het moment dat de goed-gereguleerde balans wordt verstoord, op alternatieve mechanismen over te gaan. Daarom kan de verstoring van een signaal transductie route ergens halverwege resulteren in averechtse effecten. Aangezien de remming van de intracellulaire routes op het niveau van de receptor geen averechtse effecten lijkt te hebben zouden specifieke remmers voor receptoren, of remmers die helemaal boven in een signaal transductie route aangrijpen, zeer potentiële kandidaten kunnen zijn voor nieuwe anti-kanker geneesmiddelen.

Natuurlijk heeft dit proefschrift ook nieuwe vragen opgeworpen, bijvoorbeeld de rol van de Flt3 receptor in de ontwikkeling van leukemie. Tot nu toe is nog niet bekend of een gemuteerde Flt3 receptor de enige factor is die bepalend is of er een leukemie ontstaat of dat er nog additionele factoren een rol spelen. Verschillende studies hebben al aangetoond dat mutaties in Flt3 geassocieerd zijn met een slechtere slagingskans na een chemotherapie behandeling. Daarom zou het van belang zijn om te kijken naar het effect van de gemuteerde Flt3 receptor op de ontwikkeling van leukemie. Verdere inzichten hierin zouden kunnen leiden tot alternative vormen van behandeling bij deze hoogst kwaadaardige ziekte.