Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/116949

File ID 116949
Filename Chapter 9: Nederlandse samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):
Type Dissertation
Title 'From the cradle to the grave' : novel therapeutic approaches to attack the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia
Author D. Hallaert
Faculty Faculty of Medicine
Year 2008
Pages 176

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/284714

Copyright

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), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

chapter 9

Nederlandse samenvatting

ACHTERGROND

Apoptose

Apoptose of geprogrammeerde celdood is een strict gereguleerd proces dat het organisme beschermt door niet gewenste cellen dood te laten gaan. Verstoring van apoptose speelt een belangrijke rol bij de maligne transformatie van cellen en draagt bij tot resistentie tegen chemotherapie. Apoptose geschiedt door middel van activatie van een specifieke groep enzymen (caspases). Deze enzymen zetten de cel aan tot de degradatie van, voor de cel belangrijke, eiwitten, wat uiteindelijk resulteert in celdood. Er zijn twee belangrijke apoptotische signaleringspaden die caspases kunnen activeren (zie hoofdstuk 1, Fig.1). Als eerste de intrinsieke route of mitochondriale apoptoseroute. Hier vindt signalering plaats via de mitochondriën, de energiecentrale van de cel. Ten tweede is er de extrinsieke route, waarbij signalering vanaf het celoppervlak plaats vindt. Regulatie van caspase activatie wordt gecontroleerd door twee families van eiwitten: de Bcl-2- en inhibitor-of-apoptosis (IAP) familie. De Bcl-2 familie bestaat uit eiwitten met een pro- (stimuleren apoptose) of anti-apoptotische (remmen apoptose af) functie. Het evenwicht tussen deze twee groepen eiwitten bepalen uiteindelijk de gevoeligheid van de cel voor apoptotische signalen. IAP eiwitten hebben een anti-apoptotische werking doordat ze kunnen binden aan caspases en daarmee hun activiteit remmen.

In verschillende soorten kanker worden afwijkingen gevonden in genen die apoptose reguleren. Een voorbeeld is het tumor suppressor gen p53 dat bij celschade de celgroei zal stopzetten (waarbij het DNA hersteld kan worden) of apoptose zal induceren (indien de schade te erg is). Hierdoor wordt het ontstaan van een tumor verhinderd. Echter, bij kanker is p53 vaak gemuteerd wat kan leiden tot een verminderde gevoeligheid voor apoptose en chemoresistentie.

Chronisch Lymfatische Leukemie

Chronisch Lymfatische Leukemie (CLL) is een bij ouderen veel voorkomende bloedkanker (leukemie), of preciezer: kanker van witte bloedcellen (lymfocyten). Er zijn drie types lymfocyten en in CLL is het de kwaadaardige B lymfocyt die de ziekte veroorzaakt. In het bloed kunnen enorme aantallen kwaadaardige B lymfocyten voorkomen. Eerst werd er verondersteld dat de toename van de B lymfocyten eerder het gevolg is van defecten in apoptose regulatie waardoor deze cellen niet verwijderd kunnen worden. Tegenwoordig is deze opvatting hervat en staat het vrijwel vast dat er ook een langzame celgroei (deling) is die voornamelijk in de lymfeklieren en het beenmerg, de zogenaamde micro-omgeving, plaatsvindt. Met de huidige

chemotherapie is het mogelijk de prognose van de ziekte tijdelijk te verbeteren door de cellen in het bloed te laten verdwijnen, maar volledige genezing is niet mogelijk. Er is nog onvoldoende inzicht in de onderliggende oorzaak van de kwaadaardige groei van de B lymfocyten in lymfeklieren en de resistentie tegen chemotherapeutica. Daarom is het noodzakelijk onderzoek te doen naar de samenhang tussen deze aspecten en nieuwe behandelingsmogelijkheden.

DOELSTELLING VAN DIT PROEFSCHRIFT

De studies beschreven in dit proefschrift hebben als doelstelling een beter inzicht te verwerven in:

1. Het werkingsmechanisme van nieuwe chemotherapeutica die onafhankelijk van het p53 pad werken. Hierbij wordt dieper ingegaan op het effect van chemotherapeutica op de apoptose signalering in CLL.
2. Het mechanisme van de verstoorde apoptose en de overleving van CLL cellen die zich in zowel het perifeer bloed als in de lymfeklier bevinden. Aan de hand van deze bevindingen wordt gezocht naar optimale therapeutische combinaties om resistentie in CLL tegen te gaan.

In hoofdstukken 2 en 3 werd het apoptose pad onderzocht van twee potentiële chemotherapeutica: een cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor (remt de celgroei) roscovitine en een inhibitor van het proteasoom (het eiwit complex in de cel dat zorgt voor de afbraak van overbodige en beschadigde eiwitten). De invloed van de micro-omgeving (in de micro-omgeving, zoals de lymfeklier en het beenmerg, vindt er interactie plaats tussen de tumorcel en niet tumorale cellen) werd in de volgende hoofdstukken bestudeerd. In hoofdstuk 4 werd onderzocht wat het verschil is in de expressie van apoptose regulerende eiwitten in CLL cellen in het perifeer bloed versus de lymfeklier en wat de functionele gevolgen van die verschillen zijn. In hoofdstuk 5 en 6 werd verder ingegaan op de functionele gevolgen met betrekking tot het overwinnen van resistentie tegen chemotherapeutica. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een in vitro (buiten het lichaam) cel systeem (model) dat de micro-omgeving gedeeltelijk nabootst.

DE RESULTATEN VAN HET PROMOTIE ONDERZOEK

Hoofdstuk 2

In dit hoofdstuk werd de apoptose route van een nieuw apoptose inducerend chemotherapeuticum, roscovitine, bestudeerd op moleculair vlak in CLL. We vonden dat in CLL cellen het pro-apoptotisch BH3-only eiwit Noxa gebonden is met het Bcl-2 homologe anti-apoptotisch eiwit Mcl-1. Tevens toonden we dat bij deze apoptose route ook het pro-apoptotisch BH3-only eiwit Bim betrokken is. Het belang van deze eiwitten in roscovitine geïnduceerde celdood werd bevestigd met behulp van RNA interferentie (remmende) technieken. Er kon geconcludeerd worden dat er in CLL een functionele interactie is tussen pro- en anti-apoptotische eiwitten en dat apoptose geïnduceerd door roscovitine een selectieve route volgt, genaamd de Mcl-1/Noxa route.

Hoofdstuk 3

In dit hoofdstuk werd aangetoond dat γ-secretase remmers, een geneesmiddel voor de behandeling van Alzheimer, ook effectief is in het induceren van apoptose in CLL. Wij ontdekten dat het toedienen van dergelijk geneesmiddel aan CLL cellen leidt tot een significante remming van het proteasoom. Het blokkeren van het proteasoom heeft als gevolg dat eiwitten zich ophopen in de cel, waarbij de accumulatie van Noxa het meest prominent was. De sleutelrol van Noxa kon worden aangetoond met RNA interferentie technieken. Deze bevindingen werpen licht op nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van CLL, maar ook voor andere types kanker. Doordat er een groot aantal γ-secretase remmers reeds beschikbaar zijn in de kliniek voor de behandeling van de ziekte van Alzheimer, zal er veel sneller een antwoord zijn voor de toepassing ervan in kanker.

Hoofdstuk 4

Eerder was er al aangetoond dat de regulatie van celdood van CLL cellen verstoord is. Er werd een uitgebreid onderzoek gedaan naar een scala van apoptose regulerende eiwitten. Het resultaat was echter paradoxaal, want naast het waargenomen anti-apoptotisch profiel was ook de expressie van de pro-apoptotische 'BH3-only' eiwitten Noxa en Bmf fors gestegen in CLL B lymfocyten t.o.v. B lymfocyten van een gezonde donor. Echter, deze analyses zijn gedaan op CLL B lymfocyten uit het perifeer bloed, die bij kweek in het laboratorium (in vitro) spontaan in apoptose gaan. Deze spontane apoptose kon voorkomen worden door condities te simuleren zoals deze voorkomen in lymfeklieren. Dit geschiedde middels het kweken van CLL cellen in de aanwezigheid van 'hulp' cellen (fibroblasten) die de CD40 receptor op CLL

cellen stimuleren (CD40 model). Deze vaststelling leidde ertoe dat er (in hoofdstuk 4) in klierweefsel van CLL patienten (ex vivo) werd gekeken naar het expressie profiel van apoptose regulerende moleculen om zo onderliggende stoornissen in apoptose genen in deze compartimenten (perifeer bloed en lymfeklier) in kaart te brengen. We konden zien dat, net als in het in vitro CD40 model, er ook in de lymfeklier een anti-apoptotisch profiel aanwezig is: de anti-apoptotische eiwiten (Mcl-1, Bcl-XL en A1) waren hoog en het pro-apoptotische eiwit Noxa was laag. Onze hypothese is dat op de plek waar groei van CLL cellen plaatsvindt door omgevingsfactoren, waarschijnlijk in de lymfeklier, de dodelijke apoptose genen onderdrukt worden waardoor er bij die cellen resistentie optreedt voor chemotherapie. Wanneer de cellen in het perifeer bloed terecht komen valt die bescherming weg, waardoor ze gevoelig worden voor apoptose en chemotherapie.

Hoofdstuk 5

Om meer inzicht te verwerven in onze hierboven opgestelde hypothese werd er in hoofdstuk 5 onderzoek gedaan naar veranderingen in het apoptotische profiel en de consequenties voor chemotherapie gevoeligheid tussen CLL cellen in de lymfeklier en cellen die de lymfeklier micro-omgeving hebben verlaten om in de periferie verder te circuleren. Deze situatie werd nagebootst *in vitro* door CLL cellen gedurende een bepaalde periode in kweek te brengen bij 'hulp' cellen (het hierboven beschreven CD40 model). Onze bevindingen toonden aan dat het gewijzigd apoptose genexpressie profiel dat wordt waargenomen na CD40 stimulatie in het CD40 model systeem normaliseert na het wegnemen van deze stimulus. Onverwachts werd echter gevonden dat het pro-apoptotisch eiwit Bim en het anti-apoptotisch eiwit Mcl-1 nog een lange tijd ontregeld waren en dit had consequenties voor de gevoeligheid voor sommige chemotherapeutica. CLL cellen werden opnieuw gevoelig voor proteasoom remmers en voor fludarabine (tegenwoordig eerstelijns therapie in CLL), maar niet voor roscovitine. Verondersteld werd dat Bim en Mcl-1 cruciaal zijn voor apoptose geïnduceerd door roscovitine. Er kon geconcludeerd worden dat de bepaling van het apoptotisch profiel en de gevoeligheid voor chemotherapeutica in het CD40 *in vitro* model waardevolle informatie zou kunnen geven voor de keuze van een geschikte therapie in CLL.

Hoofdstuk 6

In hoodstuk 6 werd er gezocht naar therapeutische strategieën om resistentie in CLL te omzeilen. Ook hier werd het CD40 model gebruikt om CLL cellen te stimuleren. Hier kon opnieuw bevestigd worden dat CLL cellen gestimuleerd via de CD40 receptor een zelfde anti-apoptotisch eiwit profiel vertonen als in de lymfeklier

(*ex vivo*) en dat deze cellen ongevoelig zijn voor alle geteste chemotherapeutica. In Chronische Myeloide Leukemie (CML) wordt hetzelfde anti-apoptotische eiwit profiel waargenomen. Bij CML is er sprake van een translocatie tussen het 9^{e} en het 22^{e} chromosoom, waardoor er het BCR/Abl fusie-gen ontstaat. Dit is een versmelting tussen het Abl-(Abelson mouse leukemia) gen afkomstig van chromosoom 9 en BCR-(breakpoint cluster region) gen van chromosoom 22. Veelbelovend in de behandeling van CML zijn de Abl-inhibitors imatinib en dasatinib. Beide middelen veroorzaakten een normalisatie van het anti-apoptotisch eiwit profiel, met als gevolg dat de CLL cellen opnieuw gevoelig werden voor alle geteste chemotherapeutica. Dit was ook het geval voor cellen van CLL patienten waarvan het p53 eiwit niet functioneel was. Er kon zo geconcludeerd worden dat combinaties van medicijnen cruciaal zijn in de behandeling van resistentie in CLL. De combinatie van Abl-inhibitors imatinib of dasatinib met andere chemotherapeutica lijken een veelbelovende benadering voor de behandeling van CLL.