



Universiteit
Leiden
The Netherlands

A sight for sore eyes : assessing oncogenic functions of Hdmx and reactivation of p53 as a potential cancer treatment

Lange, J. de

Citation

Lange, J. de. (2012, May 9). *A sight for sore eyes : assessing oncogenic functions of Hdmx and reactivation of p53 as a potential cancer treatment*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18929>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18929>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/18929> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Lange, Job de

Title: A sight for sore eyes : assessing oncogenic functions of Hdmx and reactivation of p53 as a potential cancer treatment

Date: 2012-05-09

Nederlandse samenvatting

Het menselijk lichaam is opgebouwd uit miljarden cellen. Cellen hebben het vermogen om zich te delen, wat nodig is voor groei en ontwikkeling en voor het herstellen van beschadigde weefsels. Het wel of niet delen van een cel is een zeer strak gereguleerd proces. Wanneer cellen aan deze regulatie ontsnappen, kan een tumor ontstaan. Tumorcellen verliezen hun normale functie, worden ongevoelig voor groeiremmende signalen van buitenaf en kunnen het orgaan beschadigen waarin ze zijn ontstaan. Bovendien kunnen (kwaadaardige) tumorcellen zich verspreiden door invasie van omringende weefsels en uitzaaiing via bloed- en lymfestromen. Elke cel bevat de complete set genetische informatie, het DNA. Daarvan wordt slechts een gedeelte gebruikt, afhankelijk van de functie van de cel en de specifieke omstandigheden. Wanneer nodig, wordt een stukje DNA (een gen) overgeschreven in messenger RNA en vervolgens vertaald in eiwit. Eiwitten zijn betrokken bij zeer uiteenlopende processen om de cel goed te laten functioneren, zoals transport, celstructuur, communicatie met andere cellen, signaaloverdracht en modificatie van andere eiwitten. De precieze volgorde van de bouwstenen van het DNA bepaalt de precieze volgorde van de bouwstenen van een eiwit. Een fout in het DNA kan dus leiden tot een fout in het eiwit, waardoor het eiwit en vervolgens de cel mogelijk niet meer naar behoren functioneert. Het is daarom van groot belang dat fouten of beschadigingen in het DNA snel worden opgespoord en adequaat worden bestreden. Het eiwit p53 speelt hierbij een cruciale rol. In gewone en gezonde cellen is p53 een grotendeels inactief eiwit, met name door toedoen van twee belangrijke p53-remmers, de eiwitten Hdm2 en Hdmx. Diverse omstandigheden die een potentieel risico vormen voor het ontstaan van kanker, bijvoorbeeld DNA schade, zuurstofgebrek of de aanwezigheid van ongewenste groeisignalen in de cel, leiden tot activering van p53. P53 zet vervolgens in de cel een heel proces in gang waarbij een groot aantal genen 'aan' dan wel 'uit' worden gezet. Dit proces kan leiden tot een tijdelijke stop van de celdeling en herstel van de schade, of tot het in gang zetten van geprogrammeerde celdood (apoptose genoemd). Dit gebeurt om te voorkomen dat de beschadigde cel een bedreiging gaat vormen voor de rest van het lichaam. Een tumor kan alleen ontstaan wanneer p53 om de een of andere reden niet werkt. Ongeveer de helft van alle menselijke tumoren heeft directe mutaties in het p53 gen, terwijl in de overige tumoren de functie van het p53 eiwit op een indirecte manier is geblokkeerd. Die cellen kunnen bijvoorbeeld een overmaat ('overexpressie') hebben van de p53-remmers Hdm2 en Hdmx. Dit proefschrift richt zich hoofdzakelijk op tumoren met 'wildtype' p53, d.w.z. er zijn geen mutaties in het p53 gen.

Na een algemene inleiding in **hoofdstuk 1** van dit proefschrift, zoomt **hoofdstuk 2** verder in op de rol van Hdmx in het ontstaan van kanker. Van een aantal soorten kanker is bekend dat Hdmx overexpressie relatief vaak voorkomt. Een bekend voorbeeld is retinoblastoma,

een tumor die ontstaat in cellen van het netvlies en bij kinderen voorkomt. Het was nog niet zeker of Hdmx overexpressie inderdaad voldoende is om p53 te remmen in het proces van normale cellen naar tumorcellen. Dit hebben wij onderzocht. Uitgangspunt van onze studie waren twee soorten ‘normale’ (niet tumor) cellen: embryonale retinoblasten (cellen waaruit retinoblastoma kan ontstaan) en huidcellen. Het bleek dat verhoogde Hdmx expressie in beide celtypen inderdaad kan bijdragen aan de zogenoemde ‘oncogene transformatie’ van deze cellen: ze gaan zich meer gedragen als tumorcellen. Een belangrijke bevinding is dat de effecten van Hdmx overexpressie vergelijkbaar zijn met die van verlies van p53.

In **hoofdstuk 3** wordt een andere oogtumor onder de loep genomen: uveale melanoma. Aangezien deze melanomen (net zoals huidmelanomen) meestal geen p53-mutaties bevatten, zou Hdmx hier een belangrijke rol kunnen spelen. Onze analyse van tumoren van deze patiënten en van cellijnen die van dergelijke tumoren zijn afgeleid, wees uit dat Hdmx overexpressie inderdaad vaak voorkomt. Het experimenteel uitschakelen (‘knockdown’) van Hdmx blokkeerde bovendien de groei van de cellen met hoge Hdmx expressie, maar niet van cellen met lagere Hdmx expressie. Verrassend genoeg bleek knockdown van p53 niet zo goed het groeiremmende effect van Hdmx knockdown te kunnen voorkomen. Dit duidt erop dat Hdmx niet alleen p53 remt, maar daarnaast ook nog een andere, p53-onafhankelijke functie heeft die nodig is voor de groei van de onderzochte uveale melanoma cellen en wellicht ook in andere kankersoorten van belang is. Nader onderzoek naar deze nieuwe functie van Hdmx leverde aanwijzingen op voor een mogelijke betrokkenheid van het eiwit p27, dat de groei van cellen kan remmen, maar de precieze werking blijft vooralsnog onbekend.

Hoofdstuk 4 focust op het gebruik van specifieke p53-activators als methode om tumoren te bestrijden. In tumorcellen waarin het p53 gen zelf nog intact is, maar de functie van het p53 eiwit is geblokkeerd, kan p53 op een slimme manier worden gereactiveerd. Nutlin-3 is een klein molecuul dat speciaal ontworpen is om te binden aan Hdm2 en daardoor de Hdm2-p53 binding te voorkomen. Hierdoor wordt p53 niet langer geblokkeerd door Hdm2 en kan het zijn groeiremmende taak gaan uitvoeren. Inderdaad bleek Nutlin-3 in staat de groei van de eerder genoemde uveale melanoma cellen te stoppen. Nutlin-3 kon tevens *in vivo* de tumorgroei afremmen in een muismodel voor uveale melanoma. Echter, de groeiremming na behandeling met Nutlin-3 kwam vooral doordat de celdeling tijdelijk stopte, terwijl voor een echt effectieve tumorbestrijding de cellen zouden moeten doodgaan. Nutlin-3 bleek veel beter te werken in combinatie met een andere drug. Zowel Topotecan, een middel dat al gebruikt wordt in chemotherapie voor sommige tumoren, als

RITA, een andere experimentele p53-activator, bleek 'synergistisch' te werken met Nutlin-3. Dit betekent dat het effect van de combinatiebehandeling sterker was dan mocht worden verwacht op basis van de opgetelde individuele effecten. Dit kwam doordat de gebruikte combinatiebehandelingen meer celdood tot gevolg hadden. Deze toename van apoptose hield verband met de toename van een bepaalde modificatie van het p53 eiwit (fosforylering van serine 46). Deze modificatie, waarvan is geclaimd dat het specifiek leidt tot p53-geïnduceerde apoptose, bleek het resultaat te zijn van een cascade van reacties die wordt gestart als gevolg van DNA schade. Het is echter onzeker of deze DNA schaderespons en p53 modificatie ook daadwerkelijk de oorzaak zijn van de toegenomen apoptose.

Hoofdstuk 5 beschrijft een nader onderzoek naar het werkingsmechanisme van het eerder genoemde stofje RITA. RITA is een aantal jaren geleden in een grote screen opgepikt op basis van zijn vermogen om celgroei te remmen op een p53-afhankelijke manier. RITA veroorzaakt een relatief hoog percentage celdood in vergelijking met andere p53 activators, en gewone cellen lijken veel minder gevoelig dan tumorcellen. Dit zijn veelbelovende eigenschappen, maar hoe RITA precies werkt op moleculair niveau is nog heel onduidelijk. Wij hebben onderzoek gedaan naar het eiwit Chk2, waarvan bekend is dat het betrokken is bij de respons op DNA schade en mogelijke problemen bij de replicatie (het verdubbelen van het DNA). Mutaties in het Chk2 gen verhogen de kans op kanker. Onze experimenten laten zien dat Chk2 een cruciale rol speelt in de effecten van RITA op de cel. Onder meer de activering van p53, inductie van DNA schaderespons en inductie van apoptose door RITA zijn vrijwel volledig afhankelijk van de aanwezigheid van Chk2 in de cel. Deze bevindingen zijn belangrijk voor het beter begrijpen van het mechanisme dat ten grondslag ligt aan de uitwerking van RITA en dus voor de bruikbaarheid ervan als potentieel medicijn tegen kanker, aangezien Chk2 niet actief is in een deel van bepaalde kankersoorten.

Hoofdstuk 6 beziet de resultaten van dit proefschrift in een bredere context. De reactivering van p53 als behandelmethode voor kanker krijgt wereldwijd veel aandacht. Ons onderzoek heeft geleid tot waardevolle nieuwe inzichten, die kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe, effectievere tumorbehandelingen. Hdmx lijkt een belangrijke rol te spelen in meerdere soorten kanker met wildtype p53, waaronder de oogtumoren retinoblastoma en uveale melanoma. Dit maakt Hdmx een interessant eiwit om therapieën op te richten. De effectiviteit van p53-activering door Nutlin-3 kan sterk verbeterd worden door het te gebruiken in slimme drugcombinaties, zoals met Topotecan of RITA. De tumorgroei-remmende effecten van de experimentele p53-activator RITA blijken

Nederlandse samenvatting

grotendeels afhankelijk te zijn van het Chk2 eiwit. Deze waarneming benadrukt het belang van een snelle analyse van een tumor voordat besloten kan worden welke behandeling van de patiënt waarschijnlijk het meest effectief zal zijn.