



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Novel functions of MDMX and innovative therapeutic strategies for melanoma

Heijkants, R.C.

Citation

Heijkants, R. C. (2018, October 18). *Novel functions of MDMX and innovative therapeutic strategies for melanoma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66268>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/66268>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66268> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Heijkants, R.C.

Title: Novel functions of MDMX and innovative therapeutic strategies for melanoma

Issue Date: 2018-10-18

APPENDIX

Dutch summary

Curriculum Vitae

List of publications

Acknowledgements

Nederlandse samenvatting

1. Innovatieve nieuwe functies van MDMX

1.1. Kanker

Een ziekte waar steeds meer mensen mee geconfronteerd worden is kanker. Dit is een ziekte van het ongecontroleerd en ongeremd delen van lichaamscellen. De oorzaak hiervan is een opeenstapeling van fouten in het erfelijk materiaal, het DNA, mutaties genoemd. Deze mutaties kunnen ervoor zorgen dat bepaalde eiwitten veranderen van eigenschappen. Zo kunnen specifieke eiwitten die celgroei en celdeling stimuleren door toedoen van mutaties altijd 'aan' staan. Op deze manier wordt een cel tot delen aangezet, terwijl dit eigenlijk niet de bedoeling is. Hoewel het essentieel is voor het ontwikkelen van kanker dat cellen over zo'n ongelimiteerd 'groeisignaal' beschikken, is dit op zichzelf niet voldoende voor het ontstaan van kanker. Er zijn, voor zover bekend, gemiddeld zes mutaties nodig om van een normale cel te veranderen in een kwaadaardige cel.

1.2. p53

Cellen beschikken over verschillende mechanismen voor het ontdekken van DNA schade en stress, die onder andere ontstaan gedurende het ontsporen van een normale cel tot een kwaadaardige cel. Op het moment dat er te veel schade en of stress wordt gedetecteerd, wordt een proces van geprogrammeerde celdood, genaamd apoptose, in werking gezet om het ontstaan van ontspoorde cellen te voorkomen. Naast het constante 'groeisignaal' moet een kankercel dus ook resistent worden voor onder andere apoptose om volledig te ontsporen en ongeremd en ongecontroleerd te kunnen blijven delen. Centraal in de herkenning van stresssituaties van een cel staat het eiwit p53. P53 is een zogenoemde transcriptie factor die op het moment van detectie van stress zorgt voor de genregulatie van eiwitten die een cel in eerste instantie doen stoppen met delen om de geïdentificeerde stressor te verwijderen. Wanneer de stresssituatie niet verbetert of de schade onherstelbaar blijkt, treedt apoptose in werking. Niet alleen ophoping van DNA schade, maar ook kankercel stimulerende mutaties kunnen zorgen voor activatie van p53. Doordat p53 een centrale rol vervult in de reactie op stress en groei stimulerende mutaties, is het gen dat codeert voor p53 vaak gemuteerd in kanker. Dergelijke inactiverende mutaties worden in ongeveer de helft van alle tumoren gevonden, wat p53 het meest frequent gemuteerde eiwit in kanker maakt. Kankercellen zonder een p53 mutatie maken gebruik van andere strategieën om p53 functie (of activiteit) te onderdrukken.

Eén zo'n strategie die kankercellen gebruiken voor het onderdrukken van p53 is het hoog tot expressie brengen van één of twee p53 remmers, genaamd MDM2 en MDMX. Deze twee eiwitten hebben als taak om in een gezonde cel p53 activiteit onder controle te houden, zodat het apoptose programma niet wordt geactiveerd en de cel onderdeel blijft uitmaken van het lichaam. Hoewel deze twee eiwitten structureel veel op elkaar lijken, verschillen ze wel in de manier waarop ze p53 remmen. MDM2 is een zogeheten ubiquitine ligase, dat ervoor zorgt dat het p53 eiwit snel wordt afgebroken. MDMX beschikt niet over deze ubiquitine ligase activiteit, maar kan wel zodanig aan p53 binden dat deze niet meer voor de inductie van een groei-stop of apoptose kan zorgen. Door MDM2 en/of MDMX hoog tot expressie te brengen kan een cel zonder p53 mutaties toch kwaadaardig worden.

1.3. Nieuwe functies van MDMX

In hoofdstuk 2 is getracht om verder de functie van MDMX te bepalen door te onderzoeken van welke genen de expressie wordt gecontroleerd door deze p53 remmer. De resultaten lieten zien dat MDMX de expressie van celdeling-stimulerende genen verhoogt, terwijl het de expressie van genen betrokken bij apoptose juist verlaagt. Deze resultaten correleren goed met de eerder beschreven oncogene functies van MDMX, waaronder de onderdrukking van p53 activiteit. Uit eerder onderzoek is echter gebleken dat MDMX ook bijdraagt aan tumorgroei en -ontwikkeling op een manier onafhankelijk van p53 remming. Inderdaad, de resultaten beschreven in hoofdstuk 2 laten zien dat een deel van de waargenomen effecten van MDMX op genregulatie onafhankelijk is van p53. Verdere diepgaande analyses van de genexpressie data suggereerden dat MDMX ook de functie van een familie van andere eiwitten beïnvloedt, de FOXO eiwitten. Deze eiwitten zijn, net zoals p53, transcriptiefactoren die een belangrijke rol spelen bij het aan- of uitzetten van genen. Een belangrijke observatie is dat MDMX, naast p53, ook aan FOXO1 kan binden. Dit zou kunnen betekenen dat MDMX niet alleen in staat is om de activiteit van p53 te remmen, maar ook van andere transcriptiefactoren zoals FOXO1. Met deze hypothese zouden mogelijk een deel van de p53-onafhankelijke oncogene effecten van MDMX verklaard kunnen worden, wat zou bijdragen aan het beter begrijpen van kanker.

Het steeds beter begrijpen van MDMX, en daarmee kanker, zou op de lange termijn kunnen leiden tot nieuwe medicijnen of therapeutische strategieën. Om deze hypothese te testen is een p53-onafhankelijk en MDMX/FOXO-gereguleerd gen, coderend voor MXD4, in meer detail bestudeerd. Resultaten suggereerden een nog niet eerder beschreven 'back-up' mechanisme waarmee een kankercel MDMX verlies zou kunnen compenseren met p53 inhibitie door MDM2. Verdere experimenten toonden aan dat MXD4 depletie in kankercellen leidt tot een verhoogde gevoeligheid voor p53-

activerende medicijnen. Deze resultaten bieden perspectief voor de toekomst van p53-activerende medicijnen en mogelijke nieuwe manieren om deze nog effectiever te laten zijn.

2. Nieuwe therapeutische strategieën voor uvea melanoom

2.1. Melanoom

Huidmelanoom is een dodelijke variant van huidkanker die ontstaat uit pigmentproducerende cellen genaamd melanocyten. Primaire melanomen kunnen vaak goed behandeld worden door middel van chirurgische verwijdering. Patiënten hebben daardoor ook een grote overlevingskans. Zodra uitzaaiingen optreden verkleint de kans op overleving echter drastisch wegens het gebrek aan effectieve therapieën. Een grote stap leek gemaakt met de ontdekking van een zeer specifieke activerende mutatie van het gen BRAF, dat in ongeveer de helft van alle melanoom patiënten voorkomt. Voor deze gemuteerde vorm van BRAF is vervolgens een medicijn ontwikkeld, wat de tumoren erg effectief deed verdwijnen. Echter, zoals vaak bij soortgelijke gepersonaliseerde medicatie, vindt de tumor na een paar maanden een andere manier om overleven en verder te groeien onafhankelijk van het gemuteerde BRAF. Een sprong voorwaarts werd gemaakt met de ontdekkingen van verschillen manieren om een patiënt zijn of haar eigen immuunsysteem kwaadaardige cellen aan te laten vallen. Deze vorm van therapie, ook wel immunotherapie genoemd, lijkt erg effectief en leidt zelfs tot genezing van sommige patiënten. Hoewel er gedurende de afgelopen decennia vooruitgang is geboekt in het verbeteren van behandelmethodes, blijft melanoom door het ontstaan van resistentie een lethale ziekte waarvoor nieuwe behandelmethodes gevonden dienen te worden.

2.2. Uvea melanomen

Een subgroep van melanoom is het uvea melanoom (UM). Deze vorm van melanoom beslaat ongeveer 5% van het totaal aantal melanomen en ontstaat uit melanocyten uit specifieke structuren in het oog, namelijk het vaatvlies, straallichaam en de iris. Net zoals huidmelanomen zijn uvea melanomen goed te behandelen tot het moment waarop uitzaaiingen plaatsvinden. Zodra metastases worden gedetecteerd, daalt de gemiddelde levensverwachting naar 2 tot 7 maanden. Er is inmiddels veel duidelijkheid over verschillende classificaties waarin een tumor kan vallen, die bepalend zijn voor het al dan niet ontstaan van metastases. Een cruciale gebeurtenis hiervoor lijkt het verlies van één van de twee kopieën van chromosoom 3. Als het andere kopie daarnaast een gemuteerd BAP1 gen bevat, resulteert dit in verlies van BAP1 expressie en een verhoogde kans op de ontwikkeling van uitzaaiingen. Hoewel het dus steeds

beter te voorspellen wordt welke patiënten metastases gaan ontwikkelen, blijft het behandelen hiervan nagenoeg onmogelijk. Dit komt omdat deze metastases tot nu toe ongevoelig lijken voor alle therapieën, met een korte levensverwachting voor de patiënt tot gevolg. Dit proefschrift focust zich daarom verder op het verbeteren van bestaande methodes en het vinden van nieuwe strategieën om patiënten met uitgezaaide UM te behandelen.

2.3. Verbetering van de huidige behandelmethodes voor gemetastaseerde uvea melanomen

2.3.1. Huidige therapieën

Zoals hierboven beschreven heeft iedere kanker mutaties nodig die voor een continue 'groeisignaal' zorgen. De mutaties die verantwoordelijk zijn voor dit signaal in UM focussen zich in een specifiek deel van de G-eiwitten GNAq of GNA11. Doordat deze eiwitten permanent 'aan' staan, wordt er constant een groei-stimulerende signaal-transductie-cascade geactiveerd. Een onmisbare stap in deze cascade is de activatie van zogeheten Protein Kinase C (PKC) eiwitten. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de remming van de activiteit van deze eiwitten een goede strategie is om de groei van UM cellen te stoppen. Het toedienen van deze remmers in de kliniek aan patiënten met uitgezaaid UM leidt echter slechts tot een stop van tumorgroei voor gemiddeld 15 weken in de helft van de patiënten. Hoewel deze resultaten veelbelovend zijn, is er in hoofdstuk 3 gezocht naar nieuwe manieren waarop de groei-remmende effecten van PKC remmers versterkt kunnen worden.

2.3.2. Combinatie met p53 activatie

Hoewel p53 mutaties zeer frequent zijn, varieert het per kankersoort in welke hoeveelheid p53 mutaties aanwezig zijn. In 90% van de eierstoktumoren worden p53 mutaties gevonden, terwijl deze nog nooit zijn gevonden in UM. Deze tumoren gebruiken vaak MDM2 en/of MDMX om p53 te onderdrukken, wat een interessante therapeutische mogelijkheid biedt. Het is namelijk mogelijk om met een 'drug' (Nutlin-3) de remming van p53 door MDMX/MDM2 te voorkomen en daarmee p53 te reactiveren. Door deze MDM2/MDMX inhibitie te combineren met PKC remming werd er een synergistische remming van overleving van verschillende UM cellijnen gevonden. Hieraan lag een omslag van groei-stop naar apoptose ten grondslag. Deze resultaten impliceren dat PKC remming en de bijbehorende positieve effecten in de kliniek versterkt kunnen worden door middel van p53 activatie.

2.3.3. MDMX/PKC δ

De combinatie van p53 activatie en PKC remming is erg effectief in het laboratorium, maar in de kliniek zouden er problemen kunnen ontstaan. Het is namelijk bekend dat

de remming van MDM2 sterke bijwerkingen tot gevolg heeft, die in eerdere klinische studies al tot een vroegtijdige stop van deze studies hebben geleid. Deze sterke bijwerkingen zijn het gevolg van de belangrijke p53-remmende rol die MDM2 heeft in gezonde cellen van het volwassen lichaam. MDMX komt in het volwassen lichaam beduidend minder hoog tot expressie dan MDM2, waardoor het waarschijnlijk is dat specifiek het voorkomen van p53 remming door MDMX in minder bijwerkingen resulteert dan de remming van MDM2 functie. In hoofdstuk 3 is daarom onderzocht of het specifiek remmen van MDMX dezelfde PKC inhibitie-versterkende effecten vertoont als Nutlin-3. Omdat er nog geen specifieke remmer van MDMX bestaat, is er gebruik gemaakt van een 'genetische truc' die leidt tot afwezigheid van MDMX. De resultaten uit hoofdstuk 3 laten zien dat depletie van MDMX de effecten van PKC inhibitie inderdaad versterkt.

Omdat ook PKC remmers vervelende bijwerkingen hebben in patiënten, vroegen we ons af of PKC remming nader gespecificeerd kon worden. De klinisch gebruikte PKC remmers onderdrukken namelijk de activiteit van alle verschillende vormen van deze eiwitten. In overeenstemming met eerder gepubliceerde data laten de resultaten in hoofdstuk 3 duidelijk zien dat afwezigheid van alleen PKC δ voldoende is om de groei van UM cellen te stoppen. Belangrijk in dit hoofdstuk is het bewijs dat p53 activatie synergistisch kan worden versterkt met de depletie van specifiek PKC δ . Concluderend, p53 activatie gecombineerd met PKC inhibitie is een synergistische werkende combinatie in de remming van UM groei, waarvan de potentiële bijwerkingen beperkt kunnen worden door de therapieën specifiek te richten op MDMX en PKC δ .

2.4. Nieuwe strategieën voor de behandeling van uitgezaaide uvea melanomen

2.4.1. EZH2- en HDAC-remming

Naast het optimaliseren van de bestaande therapieën richt dit proefschrift zich ook op het vinden van compleet nieuwe strategieën die gebruik maken van al goedgekeurde medicijnen. De nieuwe strategie bestudeerd in hoofdstuk 4 is gebaseerd op literatuur waarin beschreven wordt dat tumoren zonder expressie van een bepaald gen (BAP1) extra gevoelig zijn voor inhibitie van het eiwit Enhancer of Zeste 2 (EZH2). EZH2 is een onderdeel van het Polycomb Repressive Complex 2, een groep eiwitten die samen de dichtheid van het DNA bepaalt door modificaties aan te brengen op histonen, de eiwitten waarop DNA zit 'opgerold'. Het ontstaan van UM metastases hangt samen met de afwezigheid van expressie van BAP1, met als gevolg dat 80-90% van alle UM metastases geen BAP1 expressie hebben. Deze resultaten tezamen suggereerden dat EZH2 remming een goede therapie zou zijn voor de behandeling van UM metastases. Echter, de resultaten uit een vervolgstudie lieten zien dat UM cellen, onafhankelijk

van BAP1 expressie, ongevoelig waren voor EZH2 inhibitie. In deze studie werden de effecten van EZH2 remming op UM groei tot maximaal 5 dagen bestudeerd. Omdat UM cellen, en zeker die cellen die geen BAP1 meer tot expressie brengen, heel langzaam delen werd het mogelijk geacht dat de effecten van EZH2 remming op langere termijn pas meetbaar zouden zijn.

En inderdaad, de data uit hoofdstuk 4 laten duidelijk zien dat UM cellen wel gevoelig zijn voor EZH2 remming. Deze groei-remmende effecten van EZH2 inhibitie waren echter pas meetbaar na een week of langer. De groeiremming die op lange termijn werd geobserveerd leek sterker te zijn in de BAP1-negatieve cellen, wat selectiviteit voor de metastase suggereert. Dit kon worden gecorreleerd aan de observatie dat de expressie van EZH2 hoger is in BAP1-negatieve tumoren, welke uitzaaiende tumoren of al ontstane metastases vertegenwoordigen.

Een opvallende observatie was dat de het moleculaire effect van EZH2 remming, een vermindering van een histon modificatie, al zichtbaar was na 24-48 uur, terwijl er dan nog geen groeiremming waar te nemen is. De resultaten in hoofdstuk 4 laten zien dat de combinatie van EZH2 remming met de inhibitie van andere histon-modificerende eiwitten, histon-deacetylases (HDACs), leidt tot een synergistische reductie van de overleving van UM cellen. EZH2 remming op korte termijn heeft geen effect op UM groei terwijl HDAC inhibitie leidt tot stop van celdeling. Echter, de combinatie resulteerde niet alleen in een celdelingstop, maar ook in celdood. Het veroorzaken van celdood kan de synergistische afname van de overleving van UM cellen verklaren. De belangrijkste conclusies uit hoofdstuk 4 zijn dat EZH2 wel degelijk effect heeft op de groei UM cellen en dat deze effecten mogelijk sterker zijn in BAP1-negatieve cellen. Het duurt echter lang, dat wil zeggen meerdere celdelingen, voordat EZH2 inhibitie in een verminderde groei van deze cellen resulteert, terwijl in combinatie met HDAC inhibitie wel op korte termijn celdood geïnduceerd kan worden. Daarom wordt in hoofdstuk 4 een combinatie van EZH2 en HDAC-remmers gesuggereerd als potentiële nieuwe therapeutische strategie voor het behandelen van gemetastaseerde UM.

2.4.2. Gecombineerde HDAC en CDK inhibitie

Hierboven zijn de experimenten besproken waarin EZH2 inhibitie wordt gecombineerd met HDAC remming om de groei en overleving van UM cellen te verminderen. Zoals al genoemd leidt HDAC inhibitie tot een celcyclus-stop van UM cellen. Het doel van de resultaten beschreven in hoofdstuk 5 was om dit effect van een HDAC remmer te versterken. Er is voor dit onderzoek gekozen voor de HDAC inhibitor Quisinostat, een experimenteel medicijn dat veelbelovende resultaten liet zien in een fase 1 klinische

studie met melanoom patiënten en ook wordt getest op patiënten met ander type tumoren.

Er is gekozen om Quisinostat te combineren met een remmer van Cyclin-Dependent Kinases (CDKs), genaamd Flavopiridol. CDKs spelen een belangrijke rol in het gecontroleerd laten verlopen van de celcyclus, maar zijn ook essentieel voor de regulatie van expressie van genen. Een goede progressie van de celcyclus is afhankelijk van een strikte volgorde en tijdige activatie en in-activatie van verschillende CDKs. In neuroblastoma cellijnen was al aangetoond dat de remming van CDKs de effecten van HDAC inhibitie kunnen versterken. Zowel Flavopiridol als Quisinostat kunnen alleen al wel een groeistop veroorzaken in UM cellen, maar de combinatie van deze medicijnen remt synergistisch de groei en leidt tot celdood.

CDKs en HDACs zijn niet specifiek ontregeld in UM cellen; deze eiwitten dragen in de meeste kankers op één of andere manier bij aan tumorprogressie. Omdat deze combinatie van medicijnen erg effectief bleek voor UM cellen, werd besloten deze ook te testen op huidmelanoom cellen. En inderdaad, ook huidmelanoom cellen bleken erg gevoelig voor de combinatie van CDK en HDAC remming. Zoals eerder besproken bestaat de huidige behandeling van BRAF-gemuteerde melanoom uit het specifiek remmen van dit geactiveerde onco-eiwit. Hoewel dit vaak erg effectief is voor een paar maanden, ontwikkelt de kanker bijna zonder uitzondering resistentie. Naast de diverse melanoom typen, gedreven door verschillende activerende mutaties, hebben we gekeken of het effect van deze combinatie anders is voor BRAF-gevoelige en -resistente cellen. Alle geteste melanoom cellen bleken zeer gevoelig voor de gecombineerde CDK- en HDAC-inhibitie.

Om de effectiviteit van gecombineerde CDK- en HDAC-remming in een meer klinische setting te testen is er gebruik gemaakt van een muismodel. In dit model groeit een menselijke huidmelanoom subcutaan (onderhuids) in muizen. Deze muizen met tumoren werden behandeld met óf alleen Quisinostat, óf alleen met Flavopiridol óf met de combinatie óf werden niet behandeld. Flavopiridol remde de groei van de tumoren terwijl Quisinostat alleen de groei al bijna volledig kon voorkomen. Daarom was er weinig toename in effectiviteit van de combinatie van remmers waar te nemen. Bovendien waren de moleculaire effecten van Flavopiridol in de tumorcellen van behandelde muizen niet goed detecteerbaar, hetgeen suggereert dat om synergistische effecten te zien er een hogere concentratie of toedieningsfrequentie van Flavopiridol gekozen dient te worden. Een belangrijk aspect om rekening mee te houden bij het bestuderen van synergistische combinaties is de aanwezigheid van negatieve bijwerkingen. Het gebeurt namelijk regelmatig dat niet alleen de anti-kanker-effecten

versterkt worden door een combinatie van medicijnen zoals onderzocht is in het laboratorium, maar in een patiënt ook de negatieve effecten synergistisch worden versterkt. Echter, een aantal muizen behandeld met Quisinostat, Flavopiridol of de combinatie hiervan werden uitgebreid onderzocht door een patholoog en er bleek amper verschil te zijn tussen de behandelingen. Dus, de combinatie van CDK en HDAC remmers zou een relatief veilige en veelbelovende nieuwe strategie kunnen zijn voor de behandeling van verschillende soorten melanoom, ook die met ontwikkelde BRAF resistentie.

3. Algemene conclusies en klinische implicaties

De studies beschreven in dit proefschrift dragen bij aan het beter begrijpen van kanker en bieden nieuwe perspectieven voor het behandelen van gemetastaseerde UM patiënten. Het ontrafelen van de functies van MDMX heeft geleid tot nieuwe inzichten en kan in de toekomst leiden tot nieuwe therapeutische strategieën. In het bijzonder zal de mogelijke regulatie van FOXO transcriptie factoren door MDMX tot vervolg onderzoek leiden, met potentieel interessante klinische mogelijkheden. De huidige strategieën om gemetastaseerde UM te behandelen zijn niet effectief en worden gekenmerkt door bijwerkingen. Dit proefschrift geeft diverse mogelijkheden om de huidige therapieën te verbeteren en compleet nieuwe strategieën die in overweging genomen kunnen worden. Echter voor de optimalisatie van de huidige therapieën dienen nieuwe medicijnen ontwikkeld te worden, hetgeen nog tijd, geld en vervolg studies gaat kosten om te realiseren. Ook de nieuwe strategieën gebaseerd op bestaande medicijnen dienen nog beter te worden bestudeerd voordat ze als vervanging van de huidige therapieën kunnen dienen.