

University of Groningen

TRAIL-induced kinases activation and apoptosis

Azijli, Kaamar

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:

2013

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

Citation for published version (APA):

Azijli, K. (2013). *TRAIL-induced kinases activation and apoptosis: towards improved death receptor targeted therapy for lung cancer*. [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 behorende bij het proefschrift van Kaamar Azijli:

“TRAIL-induced kinases activation and apoptosis: towards improved death receptor targeted therapy for lung cancer”

NEDERLANDSE SAMENVATTING

INLEIDING

Longkanker is een van de meest voorkomende soorten kanker in de westerse wereld en is verantwoordelijk voor het grootste aantal kanker gerelateerde sterftegevallen. In de afgelopen decennia daalde de longkankersterfte bij mannen, terwijl het bij vrouwen juist toenam wat toegeschreven wordt aan een stijging van het aantal vrouwelijke rokers. Longkanker staat bekend om zijn sluipende karakter, omdat symptomen laat optreden en de ziekte in de meeste gevallen pas in een vergevorderd stadium wordt gevonden. Vanuit diagnostisch en behandelings perspectief wordt longkanker in twee groepen onderverdeeld, namelijk het kleincellige longcarcinoom, ongeveer 20% van alle longtumoren, en het niet-kleincellige longcarcinoom, dat in 80% van de gevallen voorkomt. Momenteel wordt het niet-kleincellig longcarcinoom via moleculaire diagnostiek in meerdere subtypes onderverdeeld, zoals mutaties in de Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), op grond waarvan besloten wordt om wel of niet een behandeling te geven met EGFR remmers. De beste behandeling voor niet-kleincellig longkanker in een niet-uitgezaaide vorm is een operatie, waarbij de gehele tumor wordt verwijderd. Wanneer de longtumor is uitgezaaid naar andere delen van het lichaam is het volledig operatief verwijderen niet meer mogelijk. In dit geval wordt de patiënt behandeld met chemotherapie en lokaal met radiotherapie bestraald om tumorcellen te doden, maar ook palliatief door hiermee bijvoorbeeld pijnklachten te bestrijden. Longkanker wordt gekenmerkt door grote moleculaire en cellulaire heterogeniteit en mede als gevolg hiervan zijn tumorcellen vaak resistent voor deze behandelingen of ontwikkelt resistentie zich tijdens de therapie hetgeen belangrijke oorzaken zijn voor de slechte prognose van longkanker. Bovendien zijn de behandelingen niet alleen cytotoxisch voor tumorcellen maar ook voor delende gezonde cellen. Hierdoor krijgen patiënten vaak last van vervelende bijwerkingen, zoals vermoeidheid, haaruitval en misselijkheid. Nieuwe behandelmethoden van longkanker zijn daarom noodzakelijk.

Het induceren van apoptose, geprogrammeerde celdood, selectief in tumorcellen en met behoud van normale cellen is een veelbelovende strategie in de behandeling van kanker. Dit kan gerealiseerd worden door het activeren van de zogenaamde Tumor Necrose Factor-gerelateerde apoptose-inducerende ligand (TRAIL) receptoren. In het laboratorium is aangetoond dat middelen die deze TRAIL receptoren activeren, zoals recombinant TRAIL en agonistische antilichamen, heel effectief tumorcellen doden, waaronder niet-kleincellige longtumorcellen. Echter een deel van de tumorcellen zijn TRAIL-resistent hetgeen voorkomen kan worden door TRAIL te combineren met chemo- en radio-therapeutica. Inmiddels zijn en worden er klinische studies uitgevoerd met TRAIL receptor agonisten tevens in combinatie met andere chemotherapieën in patiënten met verschillende tumor typen. Een eigenschap van TRAIL die tot dusver in een klein aantal studies in het laboratorium gerapporteerd is, is dat het soms aanleiding kan geven tot groei van (tumor)cellen en het stimuleren van celmigratie en invasie. Dit ongewenste effect van TRAIL is nog niet goed bestudeerd en de moleculaire mechanismen hiervan zijn grotendeels onbekend.

In dit proefschrift hebben we de signalering van de TRAIL receptoren onderzocht in niet-kleincellig longkanker, waaronder de niet-apoptotische effecten zoals tumorcelmigratie en invasie in TRAIL resistente tumorcellen. Hierbij is vooral de rol van eiwit kinases bestudeerd, eiwitten die belangrijk zijn bij de transductie van signalen in de cel door het fosforyleren van substraten. Ook is de werking van een aantal nieuwe middelen onderzocht op het voorkomen van TRAIL resistentie en het celdodend effect van TRAIL te versterken.

EFFECTEN OP EIWIT KINASES

Een korte inleiding en een overzicht van de inhoud van dit proefschrift is te vinden in **hoofdstuk 1**. In **hoofdstuk 2** worden eiwit kinases die door TRAIL kunnen worden geactiveerd besproken. Dit zijn o.a. IκB, NF-κB, MAPKs, JNK, p38, ERK1/2, MAP3K, TAK1, PKC, PI3K/Akt en Src. De activatie van deze proteïne kinases kunnen voor uiteenlopende effecten zorgen, zoals celoverleving, celdeling en uitzaaiing. De rol van Src hierbij is ontdekt in een studie beschreven in hoofdstuk 4 van dit proefschrift.

In **hoofdstuk 3** hebben we de kinase kinetiek en het effect op apoptose van TRAIL-geïnduceerde p38 en JNK activatie onderzocht in niet-kleincellige longkanker cellen met verschillende gevoeligheden voor het celdodend vermogen van TRAIL. Fosforylatie van deze twee eiwit kinases door TRAIL was waarneembaar in de apoptose gevoelige H460 cellijn en niet in de resistente A549 cellijn. De rol van p38 en JNK in TRAIL signalering werd bestudeerd d.m.v. selectieve eiwit kinase remmers en RNA interferentie (siRNA), waarmee de eiwitexpressie wordt verlaagd. Deze experimenten hebben aangetoond dat p38 nodig is voor TRAIL-geïnduceerde celdood in H460 cellen. Echter, activatie van JNK bleek TRAIL-geïnduceerde apoptose tegen te werken. Het onderliggende mechanisme van activatie en apoptose beïnvloeding is in meer detail onderzocht. Eerdere studies hadden aangetoond dat het eiwit kinase RIP1 betrokken is bij “de alternatieve TRAIL signalering”, namelijk de activatie van eiwit kinases door dit ligand. Door gebruik te maken van short hairpin RNA tegen RIP1, hebben we laten zien dat p38 fosforylatie zowel RIP1 afhankelijk als onafhankelijk is; JNK fosforylatie daarentegen was RIP1 afhankelijk. Verder was caspase-8 noodzakelijk voor JNK activatie, maar speelde het geen rol in de fosforylering van p38. Het apoptose regulerend eiwit Mcl-1 kan apoptose remmen en bleek een downstream target te zijn van zowel p38 als JNK. De activatie van JNK door TRAIL bleek de expressie van Mcl-1 te verhogen, terwijl activatie van p38 door TRAIL juist de Mcl-1 expressie verlaagde, waaruit de tegenovergestelde effecten van p38 en JNK op apoptose te verklaren zijn. Activatie van JNK werd echter niet in alle onderzochte niet-kleincellige longkankercellen waargenomen. Het gebruik van eiwit kinase remmers tegen JNK kan dus in sommige niet-kleincellige longkankercellen TRAIL apoptose versterken. Remmers van Mcl-1 in combinatie met TRAIL zouden dan een effectieve alternatieve strategie kunnen vormen voor het doden van niet-kleincellige longkankercellen.

Een onverwachte en weinig begrepen eigenschap van TRAIL is de inductie van migratie en invasie in tumorcellen. In **hoofdstuk 4** hebben we dit bestudeerd in niet-kleincellige longkanker cellijnen met verschillende gevoeligheden voor TRAIL. In TRAIL resistente niet-kleincellige longkanker cellen werd een migratie en invasie-stimulerend effect van TRAIL waargenomen. Met behulp van een ‘proteïne kinase profiling’ techniek, die gebruik maakt van peptide microarrays zijn de eiwit kinases in kaart gebracht die door TRAIL geactiveerd worden in de resistente A549 cellijn, maar niet in apoptose gevoelige H460 cellen. Na het valideren van een aantal eiwit kinases hebben we ontdekt dat de Src-STAT3 pathway verantwoordelijk is voor TRAIL-geïnduceerde migratie en invasie. De activatie van deze route bleek RIP1 afhankelijk te zijn. Het verlagen van de expressie van dit eiwit met een short hairpin RNA en het remmen van RIP1 met necrostatin-1 zorgde er namelijk voor dat TRAIL niet meer in staat was Src en STAT3 te fosforyleren/ activeren. Op dit moment weten we niet of deze route ook in andere kankersoorten geactiveerd kan worden door TRAIL. Echter, ongewenste effecten van TRAIL of TRAIL resistentie dienen in een therapeutische setting voorkomen te worden. Dit kan bereikt worden door, zoals eerder genoemd, TRAIL te combineren met andere geneesmiddelen, maar ook door toepassing van specifieke eiwit kinase remmers, zoals bijvoorbeeld Src en STAT3 remmers.

COMBINATIE STUDIES

In het tweede gedeelte van dit proefschrift is het mogelijke TRAIL apoptose versterkende effect van een aantal nieuwe antikankermiddelen onderzocht bij niet-kleincellige longtumorcellen. In **hoofdstuk 5** is het effect van een Hsp90 remmer, 17-AAG, op TRAIL apoptose onderzocht. Het Hsp90 eiwit speelt een rol bij de regulatie van verschillende eiwitten, waaronder de voor celdeling en celoverleving belangrijke eiwit kinases Akt, Erb2 en Raf-1. 17-AAG was in staat de TRAIL-geïnduceerde apoptose te versterken in de longkankercellen A549 en H460. Dit ging voornamelijk gepaard met een verhoogde activatie van de extrinsieke apoptose pathway. Co-incubatie

met TRAIL en 17-AAG resulteerde in een toename van RIP1 afbraak en een verlaging van Akt en ERK expressies, eiwit kinases die celoverleving en proliferatie bevorderen. Inderdaad bleek het remmen van Akt met de chemische stof LY290042 de TRAIL-geïnduceerde apoptose te versterken. De Hsp90 remmer, 17-AAG blijkt dus een mogelijke kandidaat voor toepassingen in combinatie met TRAIL receptor agonisten voor een betere tumorcelddodding.

Trifluorothymidine (TFT) is een nieuw chemotherapeuticum waarvan we het mogelijke TRAIL apoptose stimulerende effect onderzocht hebben in **hoofdstuk 6**. De chemische structuur van TFT is gebaseerd op de bouwstenen van DNA met een toevoeging van extra fluorgroepen. TFT kan worden ingebouwd in het DNA en zorgen voor DNA schade met tumorcelddood als gevolg. In een aantal niet-kleincellige longkankercellen was cytotoxische synergie te zien na TRAIL/TFT incubatie. De behandeling had een effect op de cel cyclus, waarbij TRAIL de cellen in de G1-fase remde en TFT in de G2/M fase. TFT activeerde het eiwit kinase Chk2 en verminderde de hoeveelheid Cdc25c, een eiwit dat cellen remt in de G2/M fase. TRAIL-geïnduceerde caspase afhankelijke apoptose werd versterkt door TFT terwijl TFT alleen ook voor caspase-onafhankelijke celdood zorgde. De versterkte inductie van apoptose kon gecorreleerd worden aan een toename van TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2) expressie; TRAIL receptor 1 (TRAIL-R1) expressie daarentegen bleef onveranderd. Door de expressie van p53 te verlagen d.m.v. siRNA, hebben we kunnen aantonen dat de toename van TRAIL-R2 door TFT, p53 afhankelijk is. Verder zorgde de TFT/TRAIL combinatie ook voor een verlaging van de XIAP en FLIP_L expressies. Deze eiwitten staan bekend om hun remmend effect op apoptose en TRAIL resistentie.

TFT wordt in hoge mate door het enzym thymidine phosphorylase (TP) afgebroken, waardoor de halfwaardetijd van TFT erg kort is, namelijk 12 minuten na intraveneuze toediening. TP komt in bepaalde tumoren sterk verhoogd tot expressie en wordt geacht een belangrijke rol te spelen in de stimulatie van angiogenese, de vorming van nieuwe bloedvaten uit bestaande bloedvaten. Het exacte mechanisme van angiogenese inductie door TP is echter niet helemaal duidelijk. Suikers die betrokken zijn bij de omzetting van thymidine naar thymine door TP spelen hoogstwaarschijnlijk een rol in dit proces. In **hoofdstuk 7** hebben we de specifieke suikers, dR-1-P en dR-5-P geïdentificeerd, die worden gevormd en uitgescheiden door cellen met hoge TP expressie. De suikers bleken voornamelijk aanwezig te zijn in het cytoskelet en in enige mate ook in het celmembraan. Dit geeft aan dat de suikers weer verder gemetaboliseerd kunnen worden in glycoproteïnen (suiker-eiwitten), die belangrijk zijn voor celsignalering en celmotiliteit. Bovendien kunnen de suikers worden omgezet in zogenaamde advanced glycation endproducts (AGE), die een rol kunnen spelen in cel migratie. De suikers die door TP worden uitgescheiden zijn waarschijnlijk op een indirecte manier betrokken bij de inductie van angiogenese.

CONCLUSIE

Het activeren van de TRAIL receptoren, TRAIL-R1 en TRAIL-R2, met TRAIL receptor agonisten leidt tot apoptose, selectief in tumorcellen en lijkt een veelbelovende strategie voor de behandeling van kanker. Een onverwacht effect van TRAIL is het stimuleren van celgroei, celmigratie en celinvasief gedrag van tumorcellen, zoals hier nu ook aangetoond is in niet-kleincellige longkankercellen. Hierbij speelt activatie van bepaalde eiwit kinases waarschijnlijk een belangrijke rol, zoals Src en STAT3 welke invasief gedrag bleken te bevorderen. Remming van eiwit kinases is daarom een interessante benadering om het antitumor effect van TRAIL te versterken. Als alternatief kunnen andere chemotherapeutische middelen ingezet worden om TRAIL-geïnduceerde celdood te versterken en resistentie te niet te doen, zoals het hier gebruikte TFT of HSP90 remmers. Verder is de verwachting dat TRAIL therapie verder verbeterd kan worden door selectie van patiënten op basis van markers die de TRAIL gevoeligheid van tumorcellen kunnen voorspellen. De expressie en activiteit van specifieke eiwit kinases kunnen mogelijk als biomarker fungeren. Ten slotte, hebben we in dit proefschrift een aantal nieuwe pre-klinische inzichten verkregen die het gebruik van apoptose-inducerende medicijnen bij de behandeling van niet-kleincellige longkanker mogelijk kunnen verbeteren.

