

University of Groningen

The missing piece

Winkle, Melanie

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:
2018

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

Citation for published version (APA):

Winkle, M. (2018). *The missing piece: Long noncoding RNAs in cancer cell biology*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

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.

Nederlandse samenvatting

RNA moleculen werden lang beschouwd als intermediair tussen DNA en eiwit, zonder specifieke eigen functie. Echter weten we nu dat RNA ook op zichzelf diverse essentiële functies kan hebben in de cel. Lange niet-coderende (lnc)RNA moleculen kunnen een regulerende rol spelen op transcriptioneel, posttranscriptioneel of eiwit niveau en zijn betrokken bij diverse normale processen. Ontregelde expressie van deze lncRNA moleculen wordt gezien in en kan betrokken zijn bij het ontstaan van diverse ziekte-gerelateerde processen. In dit proefschrift wordt de expressie en functie van lncRNAs in normale B cellen en in B cel lymfomen bestudeerd.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de actuele literatuur over lncRNA expressie tijdens B cel ontwikkeling en de veranderingen in expressie patronen in B cel lymfomen. Bovendien wordt het potentiële gebruik van lncRNAs als biomarkers voor lymfoom progressie of therapie respons, en als nieuwe therapeutische targets besproken.

Normale B cellen laten een celtype specifiek lncRNA expressie profiel zien. Dit profiel is veel karakteristieker per celtype dan dat van eiwit coderende genen. Verder laten lncRNA expressie patronen in verschillende B cel stadia een duidelijke correlatie zien met belangrijke differentiatie factoren, wat pleit voor een actieve rol voor lncRNAs in de regulatie van de B cel ontwikkeling. lncRNA expressie studies in B cel lymfomen zijn nu nog beperkt tot het Hodgkin lymfoom (HL), diffuus grootcellig B-cel lymfoom (DLBCL), mantelcel lymfoom (MCL), chronische lymfatische leukemie (CLL) en Burkitt lymfoom (BL). In alle lymfoom subtypes wordt een duidelijk veranderd expressie profiel gevonden en dit heeft geleid tot de identificatie van potentiële nieuwe biomarkers in DLBCL, MCL en CLL, die te meten zijn in het tumor weefsel of in de circulatie. Voor enkele lncRNAs is reeds een functioneel verband gelegd met lymfoom biologie, met actieve rollen in bijvoorbeeld apoptose (FAS-AS1, lincRNA-p21, NEAT1), cel cyclus regulatie (MINCR, LUNAR1) of proliferatie (HOTAIR, GAS5, MALAT1). Bovendien lijkt het oncogen Myc een belangrijke rol te spelen in de (de)regulatie van lncRNAs in B cel lymfoom.

Gezamenlijk laten deze studies zien dat lncRNAs een belangrijke rol spelen bij zowel normale B cel ontwikkeling als ook in B cel lymfoom. Dit alles wijst erop dat lncRNAs belangrijke factoren kunnen worden voor de diagnostiek en behandeling van lymfomen.

In **Hoofdstuk 3** bestuderen we de expressie van lncRNAs in normale, gesorteerde B cel populaties en in HL cellijnen. Het HL heeft in tegenstelling tot andere soorten kanker, slechts een laag percentage tumorcellen in een achtergrond van reactieve immuun cellen en is daardoor relatief moeilijk te bestuderen in primaire weefsels. De tumorcellen zijn afkomstig van kiemcentrum (germinal center, GC) B cellen, maar hebben hun normale B cel expressie profiel verloren.

Het lncRNA expressie profiel in normale naïeve en memory B cellen was zeer vergelijkbaar, met slechts twee lncRNAs die een significant verschil in expressie lieten zien. De snel-delende GC B cellen lieten een sterk afwijkend lncRNA profiel zien in vergelijking met naïeve en memory B cellen, met 251 differentieel tot expressie komende lncRNAs. Tussen GC B cellen en HL cellijnen kwamen 475 lncRNAs differentieel tot expressie. Hiervan hadden 74% van de lncRNAs een verhoogde expressie in HL cellijnen en 26% een verlaagde expressie vergeleken met normale GC B cellen. In overeenstemming met het GC-origine van HL clusterden de HL monsters met of naast GC B cellen en apart van de naïeve en memory B cellen. Voor drie van de lncRNAs die hoog tot expressie kwamen in HL cellijnen voerden we fluorescente in situ hybridisatie (RNA-FISH) uit. Alle drie, LINC00116, LINC00461 en FLJ42351, lieten een duidelijk tumor cel specifiek expressie patroon zien in primair HL weefsel. LINC00116 was bovendien ook verhoogd in BL cellijnen, terwijl LINC00461 en FLJ42351 ook verhoogd waren in DLBCL cellijnen en Epstein Barr virus (EBV)-getransformeerde lymphoblastoïde cellen. Met behulp van een co-expressie analyse van lncRNA-mRNA paren in GC B cellen en HL konden wij bovendien 57 lncRNAs identificeren die mogelijk hun eiwit partner in *cis* reguleren. Onder deze potentiële *cis*-regulatoren waren ook LINC00461 (naast MEF2C) en FLJ42351 (naast SLC20A1). Deze twee transcripten lieten bovendien een nucleaire lokalisatie zien, wat in overeenstemming is met een mogelijke rol in genregulatie.

Deze studie wijst er dus op dat er een sterke regulatie van lncRNA expressie is tijdens de kiem centrum reactie en geeft aan dat dit profiel verder is gedereguleerd in HL. Voor de drie geteste lncRNAs met hoge expressie in HL cellijnen konden we ook in primaire weefsels tumor cel specifieke expressie patronen aantonen. Zulke lncRNAs zouden dus belangrijke biomarkers kunnen worden voor de diagnostiek van HL.

In **Hoofdstuk 4** hebben we de regulatie van lncRNAs door de oncogene transcriptie factor Myc onderzocht. Myc overexpressie als gevolg van een chromosomale translocatie of door amplificatie van het gen speelt een belangrijke rol in het ontstaan van BL en DLBCL. Het is reeds bekend dat Myc een groot aantal eiwitten en micro (mi) RNAs reguleert en zo celgroei, apoptose en transformatie kan beïnvloeden. Om Myc-gereguleerde lncRNAs te definiëren hebben we gebruik gemaakt van het P493-6 B cel model. Dit is een cellijn met een conditioneel Myc allel, waarin de expressie kan worden uitgeschakeld door toevoeging van tetracycline.

We hebben RNA geïsoleerd in de MycON en de MycOFF staat, en daarnaast ook 4 en 24 uur na re-inductie van Myc in deze P493-6 cellen. Dit gaf ons de mogelijkheid onderscheid te maken tussen vroege (directe) en late (mogelijk indirecte) responsen. 1,244 lncRNA loci lieten differentiële expressie zien tussen de MycOFF en een van de drie Myc on condities. 30% van deze lncRNA loci reageerden al vroeg (binnen 4h) op de inductie van Myc. Myc-gereguleerde eiwit coderende transcripten lieten een soortgelijk expressie patroon zien en waren sterk verrijkt voor genen die in eerdere studies geïdentificeerd waren als Myc-targets.

Uit verdere analyses bleek dat Myc-geïnduceerde lncRNAs vaak al op een laag niveau tot expressie kwamen zonder de inductie van Myc. Dit is in overeenstemming met een recente hypothese dat Myc een versterker is van genen die al tot expressie komen in de betreffende cellen. In overeenstemming hiermee, zagen we een verrijking van Myc bindingsplaatsen in de geïnduceerde, maar niet in de onderdrukte eiwit coderende genen. Voor lncRNAs zagen we een verrijking voor Myc bindingsplaatsen in geïnduceerde en onderdrukte targets. Deze data suggereren dat de Myc-regulatie van lncRNA genen anders is dan die van eiwit coderende genen.

Gene expressie analyse in subcellulaire fracties van P493-6 cellen liet zien dat de meerderheid (60%) van de lncRNAs een kern specifieke lokalisatie had. Zulke lncRNAs kunnen potentiële een rol spelen in genregulatie. Om genregulatie in *cis* verder te bekijken identificeerden we lncRNA-mRNA paren die gezamenlijk gereguleerd werden door Myc. Voor 105 lncRNAs konden we op deze manier een potentiële *cis*-regulerende rol definiëren.

Om de Myc-regulatie van deze lncRNAs *in vivo* verder te onderbouwen, bekeken we hun expressie in primaire lymfomen met hoge (BL) of lage Myc levels (CLL). De grote meerderheid van de lncRNAs liet het verwachte expressiepatroon zien in BL vergeleken met CLL. Bovendien konden we de Myc-regulatie van enkele lncRNAs valideren in BL cellen waarin we het Myc gen hadden uitgeschakeld met behulp van shRNAs.

Deze studie laat dus zien dat lncRNAs een belangrijk component zijn van het Myc netwerk in B cellen. Verder toonden we aan dat lncRNAs ook direct kunnen worden geremd door Myc, iets wat voor eiwit coderende Myc-targets niet zo is. De identificatie van 105 potentiële *cis*-regulerende lncRNAs suggereert dat lncRNA deregulatie verdere downstream veranderingen in de cel kan veroorzaken.

In **Hoofdstuk 5** bestudeerden we Myc-gereguleerde lncRNAs en hun rol in lymfom pathogenese verder in een additioneel experimenteel cellijn model. Door dit model met onze eerdere modellen en met Myc ChIP data te overlappen konden we lncRNAs die met hoge waarschijnlijkheid directe Myc-targets zijn identificeren.

BL cellijnen zijn zoals verwacht sterk afhankelijk van hoge Myc expressie niveaus. Myc depletie door shRNAs induceerde een sterke reductie in celgroei in drie BL cellijnen, waarvan ST486 cellen het sterkste fenotype lieten zien. Met behulp van genexpressie analyse in Myc shRNA en controle ST486 cellen konden we 324 Myc-gereguleerde lncRNAs aantonen. Eiwit coderende genen gereguleerd door Myc in ST486 cellen lieten een significant overlap zien met bekende Myc-target genen. Myc-gereguleerde lncRNAs lieten ook het verwachte verschil zien in expressie tussen primaire BL en CLL met hoge en lage Myc expressie, respectievelijk.

De analyse van de aanwezigheid van CpG eilanden en Myc en Max bindingsplaatsen rond de Myc gereguleerde genen liet zien dat deze factoren allemaal vaker voorkomen in de buurt van eiwit coderende genen in vergelijking met lncRNA loci. Alle Myc-gereguleerde eiwit coderende genen waren verrijkt voor CpG eilanden en Myc en Max bindingsplaatsen, met een sterkere verrijking voor Myc-geïnduceerde dan Myc-onderdrukte genen. Myc-gereguleerde lncRNA genen lieten een ander patroon zien, met sterke verrijking van CpG eilanden en Myc en Max binden in onderdrukte lncRNAs, en alleen verrijking van CpG eilanden en Myc, maar niet Max bindingsplaatsen in Myc geïnduceerde lncRNAs.

Om directe Myc-target kandidaat lncRNAs te selecteren voor verdere studies, hebben we naast de MYC shRNA dataset additionele datasets gebruikt. 445 lncRNAs toonden een vroege respons na Myc inductie in P493-6 cellen en zo'n 2,000 lncRNA loci zijn gebonden door Myc in BL cellijnen. Overlap van deze data met onze 324 in ST486 geïdentificeerde lncRNA loci resulteerde in zes loci die met hoge waarschijnlijkheid direct gereguleerd worden door Myc in BL; twee daarvan werden geïnduceerd en vier onderdrukt.

De top kandidaten, Myc-geïnduceerd KTN1-AS1 en Myc-onderdrukt MELLR-1, werden verder bestudeert in een verzameling van normale B cellen, lymfoom cellijnen en primaire lymfomen. KTN1-AS1 expressie was sterk verhoogd in lymfoom cellijnen met hoge Myc expressie in vergelijking met normale B cellen. BL lieten ook een verhoogde KTN1-AS1 expressie zien ten opzichte van CLL met qPCR, terwijl dit verschil niet significant was in de nanostring analyse. Verder was er geen significant verschil te zien tussen ABC of GCB type DLBCL. MELLR-1 kwam hoger tot expressie in memory B cellen vergeleken met GC B cellen, en enkele HL, DLBCL en BL cellijnen hadden ook een verhoogde MELLR-1 expressie. MELLR-1 expressie in lymfomen liet een omgekeerd patroon zien met Myc expressie, met de hoogste MELLR-1 levels in CLL. Verder was er ook een significant hogere expressie in GCB vergeleken met ABC DLBCL.

Om de rol van Myc-geïnduceerd KTN1-AS1 verder te onderzoeken hebben we eerst gekeken naar de subcellulaire lokalisatie. KTN1-AS1 bleek voornamelijk in de kern te zitten, wat een mogelijke rol in genregulatie aangeeft. De depletie van KTN1-AS1 met twee individuele shRNAs bleek geen effect te hebben op het naburige gen KTN1 in *cis*. Genexpressie analyse na KTN1-AS1 depletie in ST486 cellen liet een verandering in expressie patroon zien van 240 mRNA en 55 lncRNA loci in *trans*. Een genset (GSEA) en transcriptie factor bindingsplaatsen (Enrichr) verrijking analyse binnen KTN1-AS1 gereguleerde genen wees op een verrijking van Myc-gereguleerde genen die betrokken zijn bij metabolisme. Met qPCR en Western Blot toonden we aan dat KTN1-AS1 depletie een reductie van Myc mRNA en eiwit veroorzaakt. KTN1-AS1 gereguleerde genen lieten bovendien een verrijkingpatroon van CpG eilanden en Myc en Max bindingsplaatsen zien. Dit lijkt erg op het patroon dat we zagen voor Myc-gereguleerde genen.

Alles bij elkaar laat deze studie zien dat onze top kandidaten met een hoge waarschijnlijkheid directe Myc-target lncRNAs zijn, die gedereguleerd zijn in primaire lymfomen. Onze analyse van KTN1-AS1 functie door middel van depletie in BL cellen wijst op een feedback loop tussen KTN1-AS1 en Myc, waarbij expressie van de een de expressie van de ander kan versterken.

In dit proefschrift hebben we het belang van lncRNA deregulatie in verschillende B cel lymfomen bestudeert. We tonen aan dat lncRNA expressie gereguleerd is tijdens normale B cel ontwikkeling en dat lncRNA expressiepatronen gedereguleerd zijn in lymfoom cellen. Individuele lncRNA transcripten die in deze studies geïdentificeerd zijn laten tumor cel specifieke expressie zien, zijn vaak gelokaliseerd in de kern en kunnen sterke effecten hebben op genregulatie in *cis* of *trans* en daarmee de groei van lymfoom cellen beïnvloeden. Deze en andere lncRNAs kunnen van belang zijn voor toekomstige verbeteringen van de lymfoom diagnostiek en behandeling.

