

Chapter

9

Summary & Samenvatting

Summary

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) accounts for approximately 40% of adult Non-Hodgkin lymphoma and is characterized by large B-cells. Although this lymphoma is classified as one disease, DLBCL is clinically, morphologically and genetically a heterogeneous group of tumors that is treated with chemotherapy (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone, CHOP) in combination with the CD20 chimeric monoclonal antibody rituximab (R). Despite this aggressive therapy, 30-40% of the patients will eventually die due to the disease. Fatal outcome usually results from failure to achieve complete remission or the occurrence of a relapse. Many studies have shown that inhibition of the apoptosis signaling pathways is strongly related to response to chemotherapy and eventual clinical outcome. Apoptosis is an ATP dependent, physiological form of cell death which can be triggered by a variety of stimuli. Upon induction of apoptosis, cysteine aspartic acid-containing proteases (caspases) are proteolytically cleaved and activated. Caspases can be divided into effector caspases (caspase 3, 6 and 7) which carry out cell death, and initiator caspases (caspase 2, 8, 9, and 10) that mainly activate effector caspases. Once activated, effector caspases execute cell death through cleavage of key cellular proteins, including substrates involved in cell structure, signaling, cell cycle control and DNA repair. Two major apoptosis pathways have been elucidated; an intrinsic stress-induced pathway and an extrinsic death receptor-induced pathway.

Intrinsic apoptosis pathway

The intrinsic or stress-induced pathway can be triggered by many stimuli, including growth factor deprivation, oxidants, Ca^{2+} overload, oncogene activation, DNA-damaging agents, and microtubule-attacking drugs. These death stimuli activate BH₃-only (Bcl-2-homology domain 3) proteins, a pro-apoptotic subgroup of the Bcl-2 family, that initiate apoptosis via direct or indirect activation of Bax (Bcl-2 associated X protein) and Bak (Bcl-2 antagonist/killer). Once activated, Bax and Bak insert in the mitochondrial outer membrane and form oligomers, resulting in mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and release of cytochrome c in the cytosol. In the cytosol, cytochrome c binds Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) and procaspase-9, resulting in a large protein complex, also designated as the apoptosome. Pro-caspase 9 becomes activated and active caspase 9 in turn cleaves and activates downstream effector caspases such as pro-caspase 3.

Extrinsic apoptosis pathway

The extrinsic or death receptor-induced pathway is triggered by binding of a ligand to death receptors (DR) of the TNF (tumor necrosis factor) -receptor super family. These death receptors contain a cytosolic death domain (DD) and include TNFR₁ (binding with TNF- α), Fas/CD95 (binding with FasL), DR₃ (binding with APO₃L), TRAIL receptor R₁/DR₄ and R₂/DR₅ (both binding with TRAIL/Apo₂L). Upon ligand binding, death receptors recruit FADD (Fas Associated Death Domain) protein, that binds directly or indirectly via TRADD pro-caspase 8 and/or 10, forming a death inducing signaling complex (DISC), resulting in activation of caspase 8 and 10. Once caspase 8 and/or 10 are activated, cells can undergo apoptosis by signaling through two different pathways. 1) Caspase 8 and/or 10 can cleave and activate pro-caspase 3 directly. 2) When the amount of caspase 3 initially activated by caspase 8 and/or 10 is insufficient to trigger the apoptotic process, caspase 3 can be activated indirectly through caspase 8 mediated cleavage of Bid, a pro-apoptotic

member of the Bcl-2 family. Cleaved Bid interacts with Bax or Bak resulting in disruption of the mitochondrial membrane and induction of the intrinsic apoptosis pathway.

This thesis summarizes our studies on mechanisms of apoptosis resistance in DLBCL and alternative targeted therapies that could restore apoptosis sensitivity.

In chapter 2, we demonstrated that a caspase 8 inhibition only profile, illustrated by low percentages of active caspase 3 positive DLBCL cells and expression of c-Flip was related to a favorable outcome, whereas a caspase 9 inhibition only profile, characterized by expression of Bcl-2 and XIAP was strongly predictive for a poor response to chemotherapy and overall survival time. Most of the chemotherapeutic drugs used in the treatment of DLBCL induce apoptosis primarily via the intrinsic caspase 9 mediated apoptosis pathway, further indicating that only inhibition of this pathway is seriously involved in resistance to chemotherapy induced apoptosis. To investigate possible mechanisms that underlie disruption of chemotherapy-induced caspase 9 mediated apoptosis, functional analysis of apoptosis pathways in DLBCL cells was necessary.

In chapter 3, we showed that apoptotic cells can be detected with an easy and highly sensitive method using 7AAD staining in combination with fluorescent beads and the pancaspase inhibitor zVAD-FMK. This method required few cells and it was possible to detect apoptosis reproducibly in isolated lymphoma cells of DLBCL biopsies and in hematopoietic cell lines.

In a previous micro array study we had demonstrated that a subset of DLBCL with poor clinical outcome was characterized by a gene expression profile reflecting constitutive activation with concomitant inhibition of the intrinsic apoptosis pathway. It seemed that intrinsic resistance to chemotherapy and clinical outcome depended on the balance between pro- and anti-apoptotic genes. We hypothesized that chemotherapy resistance was caused by inhibition of the intrinsic apoptosis pathway. In chapter 4, we found that expression profiles of apoptosis related genes in isolated lymphoma cells divide DLBCL cases into one group with low expression levels of both pro- and anti-apoptotic genes and one group with high expression levels of these genes. DLBCL with high expression levels of pro- and anti-apoptotic genes frequently appeared to be chemotherapy-refractory and were characterized by high levels of constitutive caspase 9 activity and mitochondrial membrane depolarization without induction of apoptosis, indicating that there is a disruption of the apoptosis pathway downstream of caspase 9 activation. In chapters 5, 6 and 7 we tested alternative therapies that could circumvent downstream disruption of the intrinsic apoptosis pathway and restore sensitivity to cell death.

We hypothesized that inhibition of the downstream anti-apoptotic protein XIAP by a XIAP antagonist would restore apoptosis sensitivity. In chapter 5, we showed that the small-molecule XIAP antagonist induced apoptosis in isolated DLBCL cells, including chemotherapy-refractory cases. XIAP antagonist-sensitive DLBCL cases were characterized by high expression levels of XIAP, relatively low expression levels of Bcl-2, and by constitutive caspase-9 activation. Furthermore, the XIAP antagonist was not toxic for peripheral blood mononuclear cells and tonsil germinal center B-cells from healthy donors.

An other pathway to induce apoptosis is the extrinsic apoptosis pathway that can be triggered by hsTRAIL/Apo2L. In chapter 6, we demonstrated that a subset of DLBCL cases including chemotherapy-refractory lymphomas was sensitive to hsTRAIL/Apo2L. In addition, hsTRAIL/Apo2L induced apoptosis in DLBCL cells and in B-cell lines demonstrated high expression levels of the apoptosis inhibitors Bcl-2 and/or XIAP, suggesting that these anti-apoptotic proteins did not contribute to resistance to hsTRAIL/Apo2L-induced apoptosis in DLBCL.

An alternative way to circumvent disruption of the apoptosis pathways is to induce cell death independent of apoptosis in DLBCL. In chapter 7, we found that the novel human type I CD20 mAb ofatumumab induced CDC in DLBCL cell lines and all chemotherapy-refractory DLBCL cases tested. Ofatumumab was more effective in inducing CDC of DLBCL cells compared to rituximab. Sensitivity of DLBCL to ofatumumab- and rituximab-induced CDC was dependent of CD55 and CD59 expression, although this inhibitory effect was relatively limited for ofatumumab-induced CDC.

Finally, in the concluding chapter 8, we describe possible mechanisms responsible for intrinsic resistance to apoptosis in DLBCL and how these mechanisms can be used in development and application of targeted therapies that can improve clinical outcome in DLBCL patients. We showed that upstream activation of the intrinsic apoptosis pathway with concomitant downstream inhibition of this pathway is a key-event in chemotherapy refractory DLBCL. Downstream inhibition of caspase 3 activity could be restored by targeting XIAP with small-molecule XIAP antagonists, either or not in combination with a Bcl-2 antagonist. In addition, *in vitro* sensitivity to the XIAP antagonist could be predicted based on biological markers suggesting the possibility of pre-defining patients most likely to benefit from XIAP antagonist therapy. We expect that especially R-CHOP refractory DLBCL patients will benefit from monotherapy with the small-molecule XIAP antagonist and that adverse side effects will be very limited.

Samenvatting

Het diffuus grootcellig B-celmyoom (DLBCL) is het meest voorkomend Non-Hodgkin lymfoom en wordt gekarakteriseerd door een diffuus groeiende proliferatie van grote B-lymfocyten. Hoewel dit lymfoom als één ziekte wordt geclassificeerd, is DLBCL klinisch, morfologisch en genetisch een heterogene groep van tumoren. DLBCL wordt standaard behandeld met chemotherapie (cyclofosfamide, doxorubicine, vincristine en prednison, CHOP) in combinatie met rituximab (R), een monoclonaal antilichaam gericht tegen het CD20 antigeen. Ondanks deze zeer agressieve therapie, sterft 30-40% van de patiënten uiteindelijk aan de ziekte. Een fataal beloop van DLBCL is het resultaat van het niet bereiken van complete remissie of het krijgen van een recidief. Voorgaande studies hebben aangetoond dat remming van de apoptose signalering routes sterk gerelateerd is aan de response op chemotherapie en het uiteindelijke klinisch beloop. Apoptose of geprogrammeerde celdood is een ATP afhankelijk fysiologische vorm van celdood, die geïnduceerd kan worden door verschillende stimuli. Na inductie van apoptose wordt een cascade van cysteine proteases (caspases) geactiveerd. Caspases kunnen worden verdeeld in effector caspases (caspase 3, 6 en 7) die de uiteindelijke celdood in werking zetten en activator caspases (caspase 2, 8, 9, en 10) die voornamelijk effector caspases activeren. De twee belangrijkste apoptose routes zijn de intrinsieke en de extrinsieke apoptose route.

Intrinsieke apoptose route

De intrinsieke apoptose route kan geactiveerd worden door o.a. chemotherapie, oncogen activatie en DNA schade. Na inductie worden “BH3-only” eiwitten geactiveerd, welke op hun beurt Bax en Bak activeren. Bak en Bax worden getranslokeerd naar de mitochondria waar ze oligomeren vormen in de membraan. Dit resulteert in permeabilisatie van de mitochondriale membraan en het vrijkomen van cytochrome c in het cytoplasma. In het cytoplasma vormt cytochrome c met Apaf-1 en procaspase-9 een eiwitcomplex, het apoptosoom. Procaspase-9 wordt geactiveerd en activeert op zijn beurt effector caspases.

Extrinsieke apoptose route

De extrinsieke apoptose route wordt geactiveerd door binding van een ligand aan zijn bijbehorende doodreceptor (DR) van de TNF (tumor necrose factor) –receptor superfamilie. Deze doodreceptoren bestaan o.a. uit TNFR1 (bindt aan TNF- α), Fas/CD95 (bindt aan FasL), DR3 (bindt aan APO3L), TRAIL receptor R1/DR4 and R2/DR5 (binden beiden aan TRAIL/Apo2L). Na ligand binding vormen de doodreceptoren met het FADD of TRADD eiwit en procaspase-8 en/of 10 het DISC complex. Hierbij wordt caspase 8 en/of 10 geactiveerd die op hun beurt weer direct of indirect de effector caspases kunnen activeren.

Dit proefschrift beschrijft het onderzoek naar mechanismen verantwoordelijk voor apoptose resistentie in DLBCL en naar alternatieve gerichte therapieën die apoptose kunnen herstellen.

In hoofdstuk 2, laten we zien dat remming van alleen de extrinsieke route door inhibitie van caspase 8 door c-Flip, geassocieerd is met een zeer goede prognose. Daarentegen is remming van de intrinsieke route door Bcl-2 en/of XIAP expressie geassocieerd met een slechte prognose. De meeste chemotherapeutica die gebruikt worden voor de behandeling van DLBCL induceren apoptose voornamelijk via de intrinsieke caspase 9 gemedieerde route. Deze gegevens suggereren dat remming van alleen de intrinsieke apoptose route echt betrokken is bij resistentie tegen chemotherapie

geïnduceerde apoptose. Om deze hypothese en mogelijke oorzaken voor remming van de intrinsieke route te onderzoeken is functioneel onderzoek van de apoptose routes in DLBCL cellen noodzakelijk.

In hoofdstuk 3, tonen we aan dat apoptotische cellen met een eenvoudige en zeer nauwkeurige methode kunnen worden gedetecteerd in geïsoleerde lymfoom cellen en in cellijnen. Deze methode maakt gebruik van 7AAD kleuring in combinatie met fluorescerende beads en de pancaspase remmer zVAD-FMK. Het voordeel van deze methode is dat er weinig cellen nodig zijn en dat het mogelijk is om apoptose reproduceerbaar te detecteren in geïsoleerde lymfoom cellen van DLBCL biopsieën.

In een eerdere micro-array studie toonden we aan dat een deel van de DLBCL met een slecht klinisch beloop wordt gekarakteriseerd door continue activatie van de intrinsieke route van bovenaf in combinatie met expressie van remmers onderaan in deze route. In hoofdstuk 4 vinden we dat op grond van expressie profielen van apoptose regulerende genen in geïsoleerde lymfoom cellen, DLBCL kunnen worden verdeeld in twee groepen. Eén groep DLBCL wordt gekenmerkt door lage expressie van zowel pro- als anti-apoptotische genen en een tweede groep DLBCL wordt gekenmerkt door hoge expressie van deze genen. Het merendeel van de DLBCL met een hoge expressie van pro- en anti apoptotische genen is chemotherapie-refractair en toont continue caspase 9 activiteit en mitochondriale membraan depolarisatie zonder inductie van apoptose. Dit suggereert dat er een blokkade aanwezig is in de apoptose route na activatie van caspase 9. In hoofdstuk 5, 6 en 7 hebben we alternatieve therapieën getest die de remming onderin de intrinsieke apoptose route kunnen omzeilen en de gevoeligheid voor celdood inductie kunnen herstellen. Een van de belangrijkste apoptose remmende eiwitten onderaan in de apoptose route is XIAP. We hebben onderzocht of functionele remming van XIAP, apoptose zou kunnen herstellen. In hoofdstuk 5 laten we zien dat de small-molecule XIAP antagonist inderdaad apoptose kan induceren in geïsoleerde DLBCL cellen, met name chemotherapie refractaire DLBCL. Lymfoom cellen die gevoelig zijn voor de XIAP antagonist worden gekenmerkt door hoge expressie van XIAP, relatief lage expressie van Bcl-2 en door continue caspase-9 activatie. De XIAP antagonist is niet toxisch voor perifere bloed mononucleaire B-cellen en voor follikel centrum cellen uit de tonsil afkomstig van gezonde donoren. Dit is begrijpelijk omdat continue caspase 9 activatie in principe alleen in maligne cellen voorkomt.

Een andere route om apoptose te induceren is activatie van de extrinsieke apoptose route door TRAIL/Apo2L. In hoofdstuk 6 tonen we aan dat een deel van de DLBCL, inclusief chemotherapie-refractaire lymfomen gevoelig is voor TRAIL/Apo2L. Bovendien induceert TRAIL/Apo2L apoptose in DLBCL cellen en B-cellijnen met hoge expressie van de apoptose remmers Bcl-2 en/of XIAP. Deze resultaten suggereren dat deze anti-apoptotische eiwitten niet betrokken zijn bij resistentie tegen TRAIL in DLBCL.

Een alternatieve route om de blokkade in de apoptose route te omzeilen is het induceren van apoptose-onafhankelijke celdood in DLBCL. In hoofdstuk 7 vinden we dat een nieuw humaan type I CD20 antilichaam ofatumumab CDC induceert in DLBCL cellijnen en alle geteste chemotherapie-refractaire DLBCL. Ofatumumab is effectiever in het induceren van CDC van DLBCL cellen in vergelijking met rituximab. De gevoeligheid voor ofatumumab- en rituximab-geïnduceerde CDC is afhankelijk van CD55 en CD59 expressie, hoewel ofatumumab geïnduceerde CDC minder wordt geremd door deze moleculen.

In het laatste hoofdstuk 8 beschrijven we mogelijke mechanismen die verantwoordelijk zijn voor intrinsieke resistentie tegen apoptose in DLBCL en hoe deze mechanismen kunnen worden gebruikt

in de ontwikkeling en toepassing van gerichte therapieën die het klinisch beloop van DLBCL patiënten kunnen verbeteren. We laten zien dat activatie boven in de intrinsieke apoptose route in combinatie met remming van deze route een belangrijke oorzaak is voor het ontstaan van resistentie tegen chemotherapie in DLBCL. Remming van caspase 3 activatie kan worden opgeheven door het remmen van XIAP met de XIAP antagonisten, eventueel in combinatie met een Bcl-2 antagonist. De gevoeligheid voor de XIAP antagonisten kan worden voorspeld op basis van biologische markers en hierdoor is het mogelijk om te bepalen welke patiënten zullen reageren op de XIAP antagonisten therapie. Op basis van onze resultaten verwachten we dat met name de R-CHOP refractaire DLBCL patiënten profijt zullen hebben van monotherapie met de XIAP antagonist met waarschijnlijk zeer beperkte negatieve bijwerkingen.



**Curriculum vitae &
List of publications**