

# Verrassende 'splicing' in hematologische maligniteiten

Surprising splicing in hematological malignancies

I. van der Werf, MSc,<sup>1</sup> prof. dr. J. Cloos<sup>2</sup>

## SAMENVATTING

In de afgelopen jaren zijn leukemische cellen zorgvuldig gekarakteriseerd met behulp van 'next generation sequencing' (NGS). Hieruit is gebleken dat het proces van pre-mRNA-'splicing' verrassend vaak ontregeld is bij patiënten met myelodysplastisch syndroom (MDS), acute myeloïde leukemie (AML), chronische lymfatische leukemie (CLL) en chronische myelomonocytenleukemie (CMML). Toch wordt het belang van pre-mRNA-'splicing' voor het functioneren van de cel vaak onderschat. Pre-mRNA-'splicing' is van groot belang voor differentiatie en proliferatie van cellen, mede door het creëren van diversiteit in ons transcriptoom. Zo bevat ons genoom 20.000 genen, maar kunnen wij meer dan 100.000 eiwitten produceren. Leukemische cellen misbruiken deze diversiteit in hun voordeel. Wij maken juist gebruik van deze leukemie-specifieke transcripten voor verbetering van diagnostiek, risicoanalyse en voor ontwikkeling van nieuwe therapieën.

(NED TIJDSCHR HEMATOL 2018;15:388-95)

## SUMMARY

Recently, leukemic cells have been extensively characterized using next generation sequencing (NGS). Many studies have shown that the process of pre-mRNA splicing is surprisingly often disrupted in leukemic cells of patients with myelodysplastic syndrome (MDS), acute myeloid leukemia (AML), chronic lymphocytic leukemia (CLL) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML). However, the importance of this process for the proper functioning of the cells has been long underestimated. Pre-mRNA splicing plays a crucial role in differentiation, proliferation and development of cells and tissues, partly by expanding the coding capacity of our genome. Our genome contains 20,000 genes, but we can produce more than 100,000 proteins. Leukemic cells use this diversity in their advantage, which in turn can be exploited to improve diagnostics and prognostic tools as well as to develop new therapies. Therefore, leukemia-associated pre-mRNA splicing offers perspective for future developments in treatment of patients with hematological malignancies.

## INLEIDING

Tijdens de ontwikkeling van acute leukemie vindt een toename van genetische en epi-genetische abnormaliteiten plaats. In de afgelopen jaren heeft het gebruik van 'next-generation sequencing' (NGS) veel inzicht gebracht in deze afwijkingen die de leukemische cellen karakteriseren. Zo zijn mutaties in genen geïdentificeerd, die coderen voor eiwitten

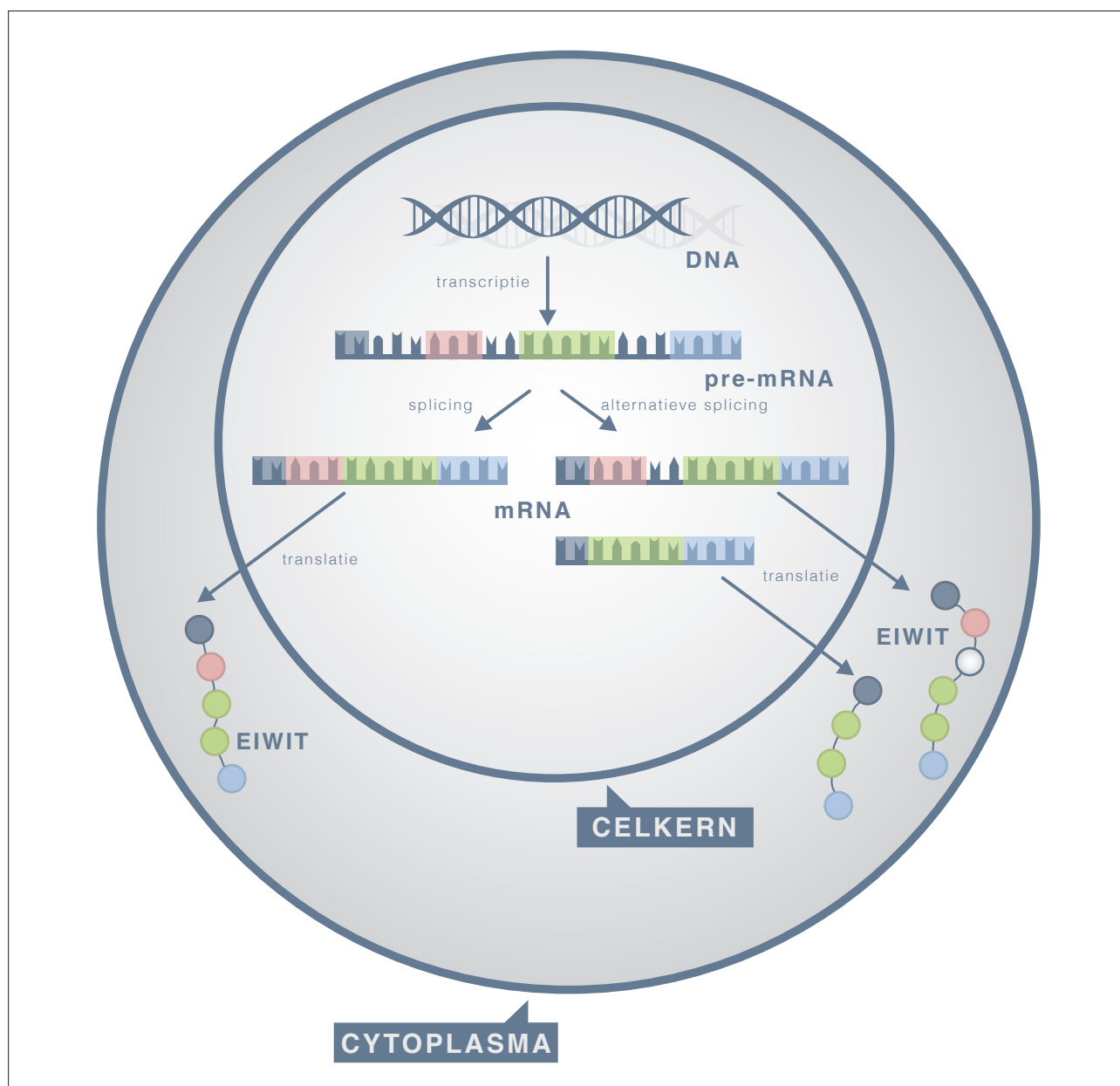
die betrokken zijn bij het knippen van 'pre-messenger' RNA (pre-mRNA-'splicing'). Een van de mutaties die tot deze categorie behoort, is een mutatie in 'splicing factor 3b subunit 1' (*SF3B1*). Deze mutatie wordt zeer frequent waargenomen bij myelodysplastisch syndroom (MDS), waar de aanwezigheid van de mutatie van belang is voor de classificatie.<sup>1</sup> Naast *SF3B1* zijn er mutaties gevonden in verschil-

<sup>1</sup>PhD-student, <sup>2</sup>medisch bioloog, afdeling Hematologie, Amsterdam UMC, locatie VUmc. Correspondentie graag richten aan mw. I. van der Werf, MSc, PhD-student, Amsterdam UMC, locatie VUmc, afdeling Hematologie, CCA 4.04, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, tel.: 020 444 73 17, e-mailadres: i.vanderwerf@vumc.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: NWO Diamond Graduate Program, Stichting Leukemie, Proximie, Stichting Egbers.

**Trefwoorden:** 'alternatieve splicing', AML, antisense oligonucleotiden, leukemie-specifieke varianten, MDS, *SF3B1*, 'splicing', 'splicing'-modulatoren

**Keywords:** alternative splicing, AML, antisense oligonucleotides, leukemia-specific variants, MDS, *SF3B1*, splicing, splicing modulators

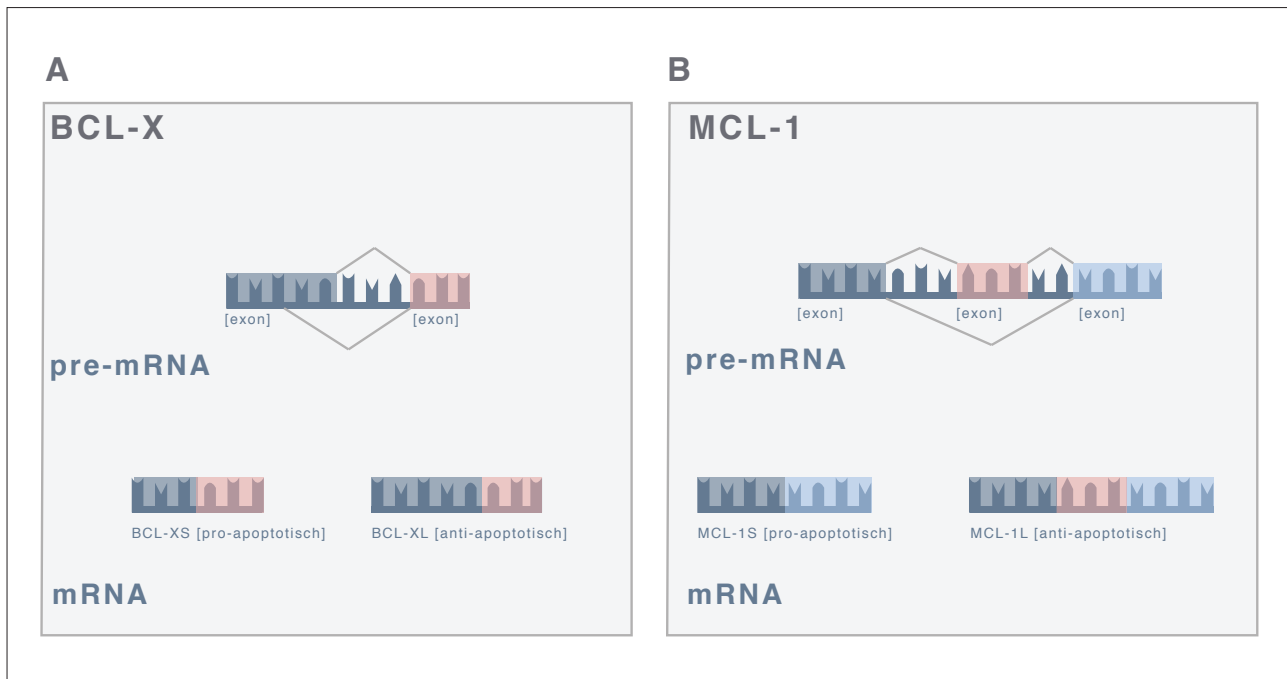


**FIGUUR 1.** DNA bevindt zich in de chromosomen die zitten opgeslagen in de kern van een cel. Het DNA codeert voor mRNA, wat codeert voor de functionele eiwitten. Voordat het mRNA kan worden omgezet naar eiwit heeft het een extra bewerking nodig, pre-mRNA wordt omgezet naar mRNA. Dit proces noemen we 'splicing'. Hierbij worden delen die niet voor eiwit coderen (intronen) uit het pre-mRNA geknipt, zodat alleen de coderende delen (exonen) overblijven en kunnen worden samen-gevoegd. Hiernaast kunnen de exonen en intronen op verschillende manieren worden gecombineerd. Dit proces kennen wij als alternatieve 'splicing'. Via deze weg kunnen verschillende transcripten, ofwel mRNA-varianten, worden gevormd. Als resultaat kan ons lichaam meer dan 100.000 eiwitten produceren, terwijl wij maar 20.000 genen tot onze beschikking hebben.

lende genen die coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij het proces van 'splicing'. Daarmee lijkt een belangrijke rol weggelegd in verschillende hematologische maligniteiten. In dit overzichtsartikel wordt besproken wat pre-mRNA-'splicing' is, hoe dit proces een rol speelt bij leukemie en op welke manier deze kennis kan worden vertaald in nieuwe behandelmethoden.

#### WAT IS PRE-mRNA-'SP LICING'?

Naast het humane genoom, wordt ook veel onderzoek gedaan naar de structuur van het genoom met bacterieel DNA. Bacteriën transcriberen hun DNA-sequenties 1 op 1 naar mRNA-sequenties, die zonder extra bewerking naar eiwit kunnen worden vertaald. Men ging ervan uit dat humane genen op dezelfde manier werden bewerkt. Richard John



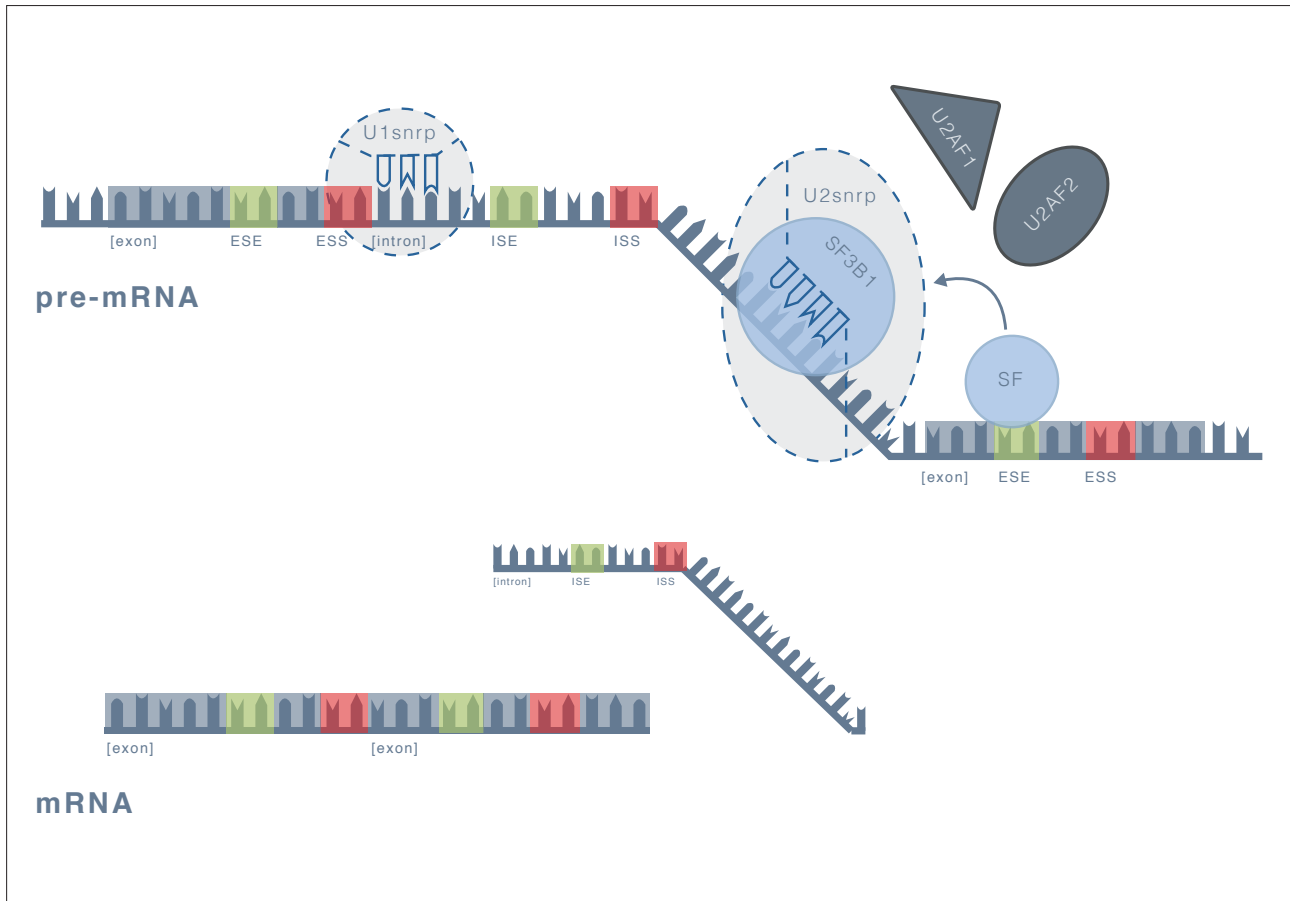
**FIGUUR 2.** Door middel van alternatieve ‘splicing’ kunnen vanaf één enkel gen vele alternatieve transcripten (varianten) worden gevormd met verschillende (zelfs tegengestelde) functionaliteiten. **A.** Exonen kunnen gedeeltelijk of in zijn geheel achterblijven in het mRNA. In het geval van *BCL-X* kan een exon geheel of gedeeltelijk worden opgenomen in het mRNA. Dit resulteert respectievelijk in een lange variant met anti-apoptotische of korte variant met pro-apoptotische eigenschappen. **B.** Alternatieve ‘splicing’ van *MCL-1* vindt plaats door het al dan niet includeren van exon 2 in het mRNA. Zo ontstaat een lange variant met anti-apoptotische eigenschappen, terwijl een korte, pro-apoptotische, variant ontstaat wanneer exon 2 niet in het mRNA wordt opgenomen.

Roberts en Phillip Allen Sharp ontdekten echter eind jaren 70 van de vorige eeuw dat dit niet geldt voor ons eigen genoom, een ontdekking waarvoor zij een Nobelprijs ontvingen.<sup>2,3</sup> Waar bacteriële genen uit aaneengesloten eiwitcoderende regio’s bestaan, worden in humane genen de eiwitcoderende regio’s (exonen) onderbroken door niet-coderende regio’s (intronen). Tijdens de vertaling van DNA naar RNA (transcriptie) worden eerst zowel de exonen als intronen omgezet naar pre-mRNA. Vervolgens worden de intronen verwijderd en de exonen samengevoegd in een proces genaamd ‘splicing’ (zie *Figuur 1*). Via deze weg wordt een functioneel mRNA gevormd dat kan worden omgezet naar eiwit (translatie).

Inmiddels is bekend dat dit proces uitermate belangrijk is voor het functioneren van de cel en zeer stringent wordt gereguleerd. Strikte regulatie is van groot belang aangezien door ‘splicing’ uiteindelijk veel verschillende eiwitvarianten worden gemaakt. Intronen kunnen achterblijven of exonen kunnen geheel of gedeeltelijk worden verwijderd, waardoor vanaf één enkel gen vele alternatieve transcripten (varianten) kunnen worden gevormd (zie *Figuur 2*).<sup>4</sup> Meer dan 90% van onze genen wordt door deze alternatieve ‘splicing’

bewerkt, waardoor ons genoom een veel uitgebreider pallet van functionaliteit tot beschikking heeft dan op basis van het aantal genen kan worden voorspeld.

‘Splicing’ wordt gefaciliteerd door het spliceosoom, een groot en dynamisch complex bestaande uit verschillende RNA-moleculen, wat de specifieke binding aan het pre-mRNA verzorgt, samen met meer dan 150 functionele eiwitten.<sup>5,6</sup> Het spliceosoom herkent sequenties die het begin en het einde van intronen aanduidt. Door middel van een wisselwerking van de eiwitten met deze specifieke RNA-sequenties worden intronen geknipt en exonen samengevoegd. Dit alles wordt geïnitieerd door ‘splicing’-factoren die de vele eiwitcomplexen, waar het spliceosoom uit bestaat, rekruteren en naar de juiste positie dirigeren. Deze ‘splicing’-factoren binden relatief korte mRNA-sequenties die belangrijk zijn voor de initiatie en regulatie van het gehele proces. Tot deze sequenties behoren signalen die ‘splicing’ promoten of juist onderdrukken. Zo bevordert een binding met een ‘exonic splicing enhancer’-sequentie de inclusie van een exon, terwijl een ‘exon splicing silencer’ voorkomt dat een exon in het mature RNA wordt ingesloten. Ditzelfde geldt voor de intronen waarbij een interactie van ‘splicing’-factoren met



**FIGUUR 3.** Het proces van 'splicing' wordt geïnitieerd door zogenoemde 'splicing'-factoren (SF) die binden aan regulerende sequenties in het pre-mRNA. In bovenstaande figuur bindt een SF aan een 'exonic splicing enhancer' (ESE). Als gevolg daarvan wordt het proces van 'splicing' in gang gezet en worden verschillende RNA-moleculen en functionele eiwitten (zoals U1snrp, gevolgd door U2snrp, SF3B1, U2AF1 en U2AF2) aangetrokken. Deze eiwitten maken deel uit van het spliceosoom en faciliteren het proces van 'splicing'. Anderzijds resulteert binding van een SF aan een 'exonic splicing suppressor' (ESS) of 'intronic splicing suppressor' (ISS) in onderdrukking van 'splicing' op deze locatie (niet weergegeven).

'intronic splicing enhancers' of 'intronic splicing silencers' de uitkomst van 'splicing' kunnen beïnvloeden (zie *Figuur 3*).

### MUTATIES IN GENEN CODEREND VOOR COMPONENTEN VAN HET SPLICEOSOOM

Aangezien de transcripten van meer dan 90% van onze genen door middel van alternatieve 'splicing' wordt bewerkt, heeft een afwijking in het proces grote gevolgen. Mutaties in genen die coderen voor eiwitten die 'splicing' initiëren en faciliteren, resulteren in enorme veranderingen over het gehele mRNA-spectrum (transcriptoom) van een cel, wat grote gevolgen heeft voor het functioneren van de cel. Deze mutaties worden waargenomen in verschillende typen kanker, maar komen in het bijzonder vaak voor in hematologische maligniteiten. Zo is een mutatie in het *SF3B1*-gen, coderend voor een kerncomponent van het spliceosoom, een van de meest frequent gevonden afwijkingen bij myelo-

dysplastisch syndroom (MDS). Opvallend is dat bij patiënten met een hoog percentage ringsideroblasten in het beenmerg (MDS met ringsideroblasten; MDS-RS) deze mutatie bij 60-85% van de patiënten aanwezig is. Cellen met ringsideroblasten zijn erytroïde precursorcellen gekarakteriseerd door een defect in het ijzertransport. Inmiddels is een duidelijke associatie gevonden tussen de aanwezigheid van de *SF3B1*-mutatie en het ontstaan van MDS-RS. Recentelijk is in *SF3B1*-gemuteerde cellen aberrante 'splicing' aangetoond van genen die betrokken zijn bij het ijzermetabolisme, hemoglobinesynthese en erytroïde maturatie.<sup>7</sup> Vandaag de dag zijn deze gegevens vertaald richting de kliniek, waar de aanwezigheid van de mutatie een belangrijke determinant is voor de diagnose MDS-RS. In aanwezigheid van de mutatie wordt de diagnose gesteld bij 5% ringsideroblasten, terwijl een percentage van minstens 15% is vereist wanneer de mutatie niet aanwezig is.

Bij patiënten met MDS zonder ringsideroblasten wordt de *SF3B1*-mutatie in 10-20% van de gevallen waargenomen. Bij deze patiënten is de rol van de mutatie ten opzichte van de ontwikkeling van de ziekte onduidelijk. Wel is bekend dat de mutatie geassocieerd is met een gunstige prognose.<sup>8</sup> Dit in tegenstelling tot patiënten met chronische lymfocytair leukemie (CLL), waar een *SF3B1*-mutatie een van de meest voorkomende moleculaire afwijkingen is, maar ongelukkigerwijs geassocieerd is met een slechte prognose.<sup>9</sup> Ook bij acute myeloïde leukemie (AML), waar de mutatie minder frequent voorkomt, is de *SF3B1*-mutatie geassocieerd met een slechte respons op de behandeling en een kleinere overlevingskans, terwijl de mutatie bij chronische myelomonocytenleukemie (CMML) niet prognostisch relevant is.<sup>10,11</sup> Aangezien de impact van een mutatie in het *SF3B1*-gen verschilt in de verschillende typen leukemie, lijkt de mutatie afhankelijk van de genetische achtergrond van de cel. Omdat er nog veel onduidelijkheden zijn over de precieze impact van de verschillende mutaties in de verschillende hematologische maligniteiten worden deze mutaties op dit moment nog niet gebruikt bij risicofificatie.

Ditzelfde geldt voor mutaties in het 'U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1' (*U2AF1*)-gen, dat net als *SF3B1* codeert voor een belangrijke component van het spliceosoom, en het 'serine and arginine rich splicing factor 2' (*SRSF2*)-gen, dat een belangrijke rol vertolkt in initiatie van 'splicing' in een scala aan genen. Ook deze mutaties zijn relatief veelvoorkomend in hematologische maligniteiten en kunnen als prognostische markers worden gebruikt. Beide mutaties zijn gerelateerd aan een verhoogde kans op progressie tot AML in MDS en geassocieerd met een slechte prognose bij AML, maar hebben geen prognostische impact bij patiënten met CMML. Opvallend is dat geen van beschreven mutaties in combinatie met elkaar voorkomen. Bij acute lymfatische leukemie (ALL) zijn tot op heden geen mutaties in een van de componenten van het spliceosoom geïdentificeerd.

### ALTERNATIEVE EN ABERRANTE 'SPICE'-VARIANTEN BIJ LEUKEMIE

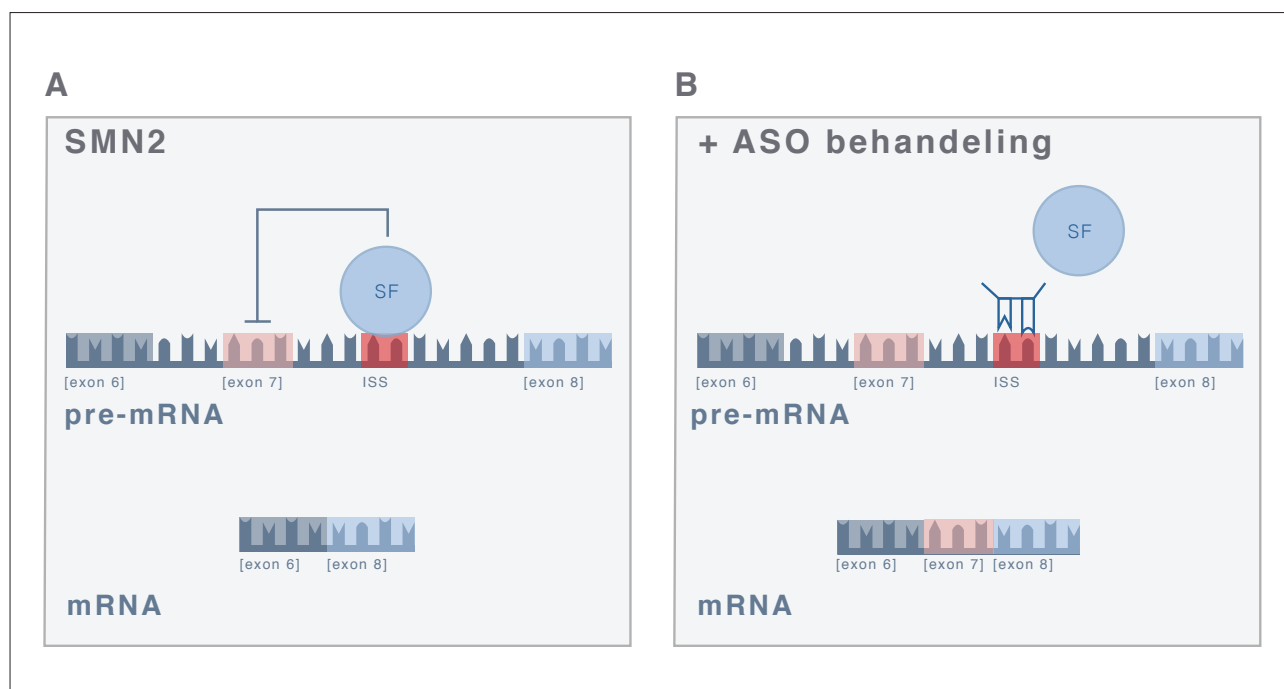
Ondanks dat mutaties in *SF3B1*, *U2AF1* en *SRSF2* lang niet bij alle patiënten met acute leukemie worden waargenomen, speelt alternatieve 'splicing' en de expressie van aberrante varianten praktisch altijd een rol in de ontwikkeling van leukemie. Ons genoom bevat ongeveer 20.000 genen, maar wij kunnen meer dan 100.000 eiwitten produceren. Alternatieve 'splicing' is hiervoor essentieel en de leukemische cellen gebruiken specifieke eiwitvarianten in hun voordeel. Een van de eerste genen waarvan alternatieve varianten zijn geïdentificeerd is het apoptotische 'B-cell lymphoma-extra' (*BCL-X*)-gen. 'Splicing' van het *Bcl-x*-pre-mRNA kan resul-

teren in de vorming van twee varianten: een korte variant met pro-apoptotische eigenschappen (*BCL-XS*) en een lange variant gekenmerkt door anti-apoptotische effecten (*BCL-XL*) (zie *Figuur 2*). Bij leukemie is de expressie van *BCL-XL* gerelateerd aan resistentie tegen conventionele therapieën, mede doordat deze variant apoptose onderdrukt en de leukemische cel op deze manier beschermt. Naast *BCL-X* zijn verschillende varianten met tegenstrijdige functies geïdentificeerd, waaronder *MCL-1* (zie *Figuur 2*), *Caspase-2*, *FAS* en *Survivin-2B*, waarvan de anti-apoptotische variant wordt geassocieerd met therapieresistentie bij verschillende tumoren.<sup>12</sup> Deze veranderingen in alternatieve 'splicing' van apoptotische genen laat zien dat 'splicing' een belangrijke rol speelt tijdens leukemogenese.

Hiernaast zijn in de loop der jaren aberrante varianten geïdentificeerd die uitsluitend in leukemische cellen worden waargenomen. Zo resulteert aberrante 'splicing' van het *GSK3β*-gen in verhoogde activiteit van  $\beta$ -Catenine, een belangrijke speler in Wnt-signalering, dat cruciaal is voor de groei van leukemiecellen in muizenmodellen.<sup>13</sup> Ook *FLT3*, een van de meest frequent gemuteerde genen bij patiënten met AML, vertoont bij meer dan 70% van de patiënten meerdere aberrante varianten, terwijl deze niet aanwezig zijn in gezond beenmerg.<sup>14</sup> Eveneens blijkt aberrante 'splicing' van het veelvoorkomende fusiegen *AML-ETO* de leukemiecellen een voordeel te geven en is expressie van aberrante varianten van het *FPGS*-gen gerelateerd met methotrexatresistentie.<sup>15,16</sup> Inmiddels hebben genomische analyses enorm veel aberrante, leukemie-specifieke, transcripten geïdentificeerd. Ongeveer 30% van de transcripten in het beenmerg van patiënten met AML is verschillend ten opzichte van gezonde donoren.<sup>17</sup> Zodoende worden ook zonder mutaties in genen zoals *SF3B1*, *U2AF1* en *SRSF2*, vele afwijkingen in het transcriptoom waargenomen. Deze verschillen met normale cellen worden momenteel bestudeerd en zouden in de toekomst een belangrijke rol kunnen vertolken als biomarker. Hiernaast bieden de verschillende afwijkingen handvatten voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën.

### 'SPICING'-GERELATEERDE THERAPIEËN

In de afgelopen jaren zijn meerdere middelen ontwikkeld die de uitkomst van 'splicing' kunnen beïnvloeden (zie overzichtsartikel<sup>18</sup>). Veel van deze middelen, zoals Spliceostatine A, Meayamycine B, Pladienolide B, en meer recent ontwikkelde E7107, I75-FD-895 en H3B-8800, moduleren het proces van 'splicing' via binding aan zowel wildtype of gemuteerd *SF3B1*. Als gevolg van blootstelling van cellen aan deze middelen wordt de binding van het *SF3B1*-eiwit met het spliceosoom ontworpen, wat resulteert in een ophoping van het pre-mRNA en een blok in de celcyclus met celdood als gevolg.



**FIGUUR 4. A.** Nadat transcriptie van het *SMN2*-gen heeft plaatsgevonden ontstaat een pre-mRNA. Omdat een 'splicing'-factor (SF) de 'intronic splicing silencer (ISS)' in intron 7 bindt, wordt 'splicing' van exon 7 onderdrukt, waardoor exon 7 niet in het mRNA wordt opgenomen. Dit resulteert in SMN-eiwit dat snel wordt afgebroken. **B.** Aangezien exon 7 wel degelijk aanwezig is in het pre-mRNA van het *SMN2*-gen, kan deze door een aanpassing in de regulatie worden opgenomen in het mRNA. Hiervoor is een antisense oligonucleotide ontwikkeld dat op de locatie van de ISS bindt. Hierdoor krijgt de SF geen kans om te binden en wordt 'splicing' van exon 7 niet langer onderdrukt. Het gevolg is een mRNA met exon 7, een stabiel SMN-eiwit en herstel van functionaliteit van de cellen.

Hoewel preklinisch veelbelovende resultaten zijn behaald, is E7107 tot dusver het enige middel waarmee klinische resultaten zijn behaald; niet bij leukemie, maar bij een scala aan solide tumoren. Helaas is deze fase 1-studie vroegtijdig gestopt wegens toxiciteit. Hoewel de groei van de tumoren werd gestabiliseerd en 'splicing'-modulatie in mononucleaire cellen van behandelde patiënten werd waargenomen, werd bij 5% (3/66) van de patiënten verlies in het gezichtsvermogen geconstateerd.<sup>19,20</sup> SF3B1 is betrokken bij de 'splicing' van vele genen, waardoor de onverwachte bijwerkingen zouden kunnen worden verklaard. Het is dan ook van groot belang om deze globale modulators in lage concentraties te gebruiken. Tot dusver lijken cellen met een mutatie in het *MYC*-gen relatief sensitief voor 'splicing'-modulatie. Een mutatie in het *MYC*-gen resulteert in verhoogde transcriptie, wat resulteert in druk op het proces van 'splicing', wat dit fenomeen kan verklaren.<sup>21</sup> Hiernaast lijken leukemiecellen van patiënten met een mutatie in *SF3B1*, *U2AF1* en *SRSF2* zeer gevoelig voor behandeling met E7107.<sup>22</sup> Met deze kennis is H3B-8800 ontwikkeld, waarmee recentelijk een nieuwe fase 1-studie is gestart bij MDS- en AML-patiënten met een mutatie in een van deze genen (NCT02841540).<sup>23</sup>

De resultaten van deze studie worden eind 2018 verwacht. Tevens laat SF3B1-modulator 17S-FD-895 in preklinische studies veelbelovende resultaten zien bij chronische myeloïde leukemie (CML).<sup>6,20,24</sup>

Aangezien de (bij)werkingen van bovengenoemde therapeutica tot nu toe breed en onvoorspelbaar zijn gebleken, zijn verschillende nieuwe strategieën ontwikkeld die de regulatie van een specifieke variant kunnen moduleren. De meest succesvolle strategie maakt gebruik van zogenoemde 'antisense oligonucleotiden' (ASO's); dat zijn korte nucleotide sequenties die een specifieke sequentie in het pre-mRNA kunnen binden. Vaak binden ontwikkelde ASO's een 'suppressor'- of 'enhancer'-sequentie, zodat een 'splicing'-factor niet kan binden en het proces op deze locatie respectievelijk niet kan remmen of initiëren.<sup>25</sup>

Begin 2017 is de allereerste 'splicing'-modulator (Nusinersen, commercieel beschikbaar als Spinraza) door de Amerikaanse 'Food and Drug Administration' (FDA) toegelaten als behandeling voor patiënten met spinale musculaire atrofie (SMA), een neuromusculaire aandoening die leidt tot het niet of onvoldoende functioneren van spieren. De ziekte wordt veroorzaakt door een deletie van het 'survival motor neuron 1'

## AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1** Het proces van 'splicing' is bij leukemie relatief vaak ontregeld door een mutatie in een van de componenten van het spliceosoom, die het proces van alternatieve 'splicing' reguleert en faciliteert, en/of door expressie van veel verschillende alternatieve en aberrante transcripten.
- 2** Mutaties in *SF3B1* komen frequent voor bij patiënten met MDS/RS, waar zij een rol vertolken in risicoclassificatie.
- 3** Modulatie van het proces van alternatieve 'splicing' door nieuwe middelen resulteert in een blokkade in de celcyclus met leukemieceldood als gevolg.
- 4** Vanwege het pleiotrope effect van 'splicing'-modulatie kunnen deze middelen onverwachte bijwerkingen geven. Hierdoor zullen lage doseringen moeten worden gegeven in bijvoorbeeld subgroepen van patiënten van wie de leukemische cellen erg gevoelig zijn door de genetische achtergrond.
- 5** Veel onderzoek richt zich op specifieke mRNA-varianten die kunnen dienen als biomarker voor voorspelling van een op handen zijnde terugkeer van de ziekte.
- 6** Ontwikkeling van zogenoemde antisense oligonucleotiden zouden in de toekomst kunnen worden gebruikt om aberrante mRNA-varianten, die van belang zijn voor overleving van de leukemische (stam)cel, te elimineren.

(*SMN1*)-gen, dat codeert voor het SMN-eiwit. Naast *SMN1* codeert ook *SMN2* voor SMN-eiwit. Het SMN-eiwit geproduceerd door het *SMN2*-gen wordt echter zeer snel afgebroken. Deze afwijking kan worden verklaard doordat exon 7 niet wordt opgenomen in het mRNA van het *SMN2*, terwijl dit wel aanwezig is in het mRNA van *SMN1* (zie *Figuur 4a*). Aangezien het *SMN2*-gen wel tot expressie wordt gebracht bij patiënten met SMA, is deze kennis vertaald in een ASO die de 'intronic splicing silencer' in intron 7 bindt. De 'splicing' van exon 7 kan op deze manier niet meer worden onderdrukt door bindingen van een 'splicing'-factor, waardoor na behandeling een transcript van het *SMN1*-gen ontstaat (zie *Figuur 4b*).<sup>26</sup> De resultaten zijn enorm indrukwekkend, waarbij de functie van spieren bij patiënten met SMA wordt behouden. Bij leukemie zijn voldoende transcripten aanwezig die op eenzelfde manier zouden kunnen worden geëlimineerd, waardoor deze innovatieve middelen in de toekomst veelbelovend zijn.

## CONCLUSIE

Afwijkingen in alternatieve 'splicing' en de aanwezigheid van aberrante varianten wordt steeds vaker beschreven in relatie tot verschillende maligniteiten en blijken verrassend vaak ontregeld in hematologische maligniteiten ('surprising splicing'). Ondanks dat vele studies zich richten op de beschreven mutaties en vele aberrante 'splice'-varianten, zal

de moleculaire kennis over deze afwijkingen in de loop der jaren moeten worden vergroot. In deze zoektocht is het van groot belang om de 'splicing'-patronen van leukemiecellen beter te begrijpen. De beschreven mutaties en de aanwezigheid van leukemie-specifieke varianten bieden perspectief voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën. De komende jaren zal veel werk moeten worden verricht om de potentie van ontwikkelde 'splicing'-modulatoren te bewijzen. Karakterisatie van de verschillende hematologische maligniteiten staat hierbij voorop, omdat de veranderde 'splicing' verschillende effecten kan hebben in cellen met verschillende genetische achtergrond. Door het globale effect van de verschillende *SF3B1*-modulatoren zal moeten worden gezocht naar patiënten die baat hebben bij modulatie van dit complexe proces.

Hiernaast zal het karakteriseren van de leukemische cellen nieuwe 'druggable targets' identificeren, die dankzij innovatieve technieken kunnen worden vertaald naar nieuwe behandelingen. Het zal hierbij van essentieel belang zijn om ons te richten op de verschillende subpopulaties cellen binnen het heterogene leukemische beenmerg. De leukemische stamcel verdient extra aandacht, aangezien deze cel vaak niet wordt geëlimineerd door huidige therapieën met terugkeer van de ziekte als gevolg. Terwijl modulatie van een specifiek transcript veelbelovende resultaten laat zien, zoals bij SMA, is het onduidelijk of het zin heeft om één enkel

'event' in de leukemische cellen te moduleren. Zeer waarschijnlijk berust het op een netwerk van veranderingen dat resulteert in ongeremde groei en blok in differentiatie. Toch bieden deze innovatieve strategieën mogelijkheden om leukemie-specifieke varianten en mutaties te controleren. Juist bij AML, waarbij patiënten nog altijd met specifieke en intensieve chemotherapieën worden behandeld, en de ziekte in veel gevallen terugkeert na een in eerste instantie succesvolle therapie, kunnen deze gerichte therapieën mogelijk in de toekomst een verschil maken.

## REFERENTIES

1. Swerdlow SH, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127:2375-90.
2. Berget SM, et al. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3171-5.
3. Chow LT, et al. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 1977;12:1-8.
4. Nilsen TW, et al. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 2010;463:457-63.
5. Dvinge H, et al. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer* 2016;16:413-30.
6. Brierley CK, et al. Targeting splicing in the treatment of myelodysplastic syndromes and other myeloid neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep* 2016;11:408-15.
7. Nikpour M, et al. The transporter ABCB7 is a mediator of the phenotype of acquired refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia* 2013;27:889-96.
8. Malcovati L, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;118:6239-46.
9. Damm F, et al. Spliceosome and other novel mutations in chronic lymphocytic leukemia and myeloid malignancies. *Leukemia* 2012;26:2027-31.
10. Hou HA, et al. Splicing factor mutations predict poor prognosis in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 2016;7:9084-101.
11. Patnaik MM, et al. Spliceosome mutations involving SRSF2, SF3B1, and U2AF35 in chronic myelomonocytic leukemia: prevalence, clinical correlates, and prognostic relevance. *Am J Hematol* 2013;88:201-6.
12. Wojtuszkiewicz A, et al. Pre-mRNA splicing in cancer: the relevance in oncogenesis, treatment and drug resistance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2015;11:673-89.
13. Abrahamsson AE, et al. Glycogen synthase kinase 3beta missplicing contributes to leukemia stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3925-9.
14. Adamia S, et al. NOTCH2 and FLT3 gene mis-splicings are common events in patients with acute myeloid leukemia (AML): new potential targets in AML. *Blood* 2014;123:2816-25.
15. Yan M, et al. A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis. *Nat Med* 2006;12:945-9.
16. Wojtuszkiewicz A, et al. Folylpolyglutamate synthetase splicing alterations in acute lymphoblastic leukemia are provoked by methotrexate and other chemotherapeutics and mediate chemoresistance. *Int J Cancer* 2016;138:1645-56.
17. Adamia S, et al. A genome-wide aberrant RNA splicing in patients with acute myeloid leukemia identifies novel potential disease markers and therapeutic targets. *Clin Cancer Res* 2014;20:1135-45.
18. Lee SC-W, et al. Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nat Med* 2016;22:976-86.
19. Eskens FA, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the first-in-class spliceosome inhibitor E7107 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2013;19:6296-304.
20. Kim YJ, et al. Therapeutic targeting of RNA splicing in myelodysplasia. *Semin Hematol* 2017;54:167-73.
21. Koh CM, et al. MYC regulates the core pre-mRNA splicing machinery as an essential step in lymphomagenesis. *Nature* 2015;523:96-100.
22. Lee SC-W, et al. Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins. *Nat Med* 2016;22:672-8.
23. Seiler M, et al. H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. *Nat Med* 2018;24(4):497-504.
24. Crews LA, et al. RNA splicing modulation selectively impairs leukemia stem cell maintenance in secondary human AML. *Cell Stem Cell* 2016;19:599-612.
25. Havens MA, et al. Targeting RNA splicing for disease therapy. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013;4:247-66.
26. Wurster CD, et al. Nusinersen for spinal muscular atrophy. *Ther Adv Neurol Disord* 2018;11:1756285618754459.

ONTVANGEN 1 APRIL 2018, GEACCEPTTEERD 11 JULI 2018.