

Abstract

The pathogenesis of B-cell malignancies depends to a large extent on B-cell receptor-dependent signaling. This vulnerability is exploited for instance by targeting PI3K-delta using the clinically used drug idelalisib. With the goal of clarifying the mode of action of idelalisib and other PI3K inhibitors by quantitatively evaluating target-selective contributions to their potency against specific oncogenic functions, mutations were introduced into the binding pocket of p110-delta to mediate inhibitor-resistance for application as chemical genetic tools. Oriented by structural alignment with known inhibitor-resistant mutants of p110-alpha, p110-delta-I777M and -I825V were designed and generated by site-directed mutagenesis for expression in cell line models.

When expressed in cell lines representing fibroblasts and malignant B-cells, one of these mutants, p110-delta-I777M, led to increased phosphorylation of AKT at serine 473 and protected pAKT levels from reduction by idelalisib compared to equal expression levels of the wild type (wt), while p110-delta-I825V showed diminished activity. Compared to wt, the novel engineered p110-delta-I777M mutant supported oncogenic cell functions, such as anchorage-independent growth of NIH 3T3 cells, B-cell receptor-triggered CCL-3 secretion by Ramos cells and chemotaxis to CXCL-12 of Ba/F3 cells, however much less than p110-alpha-H1047R with known oncogenic features. For further investigated oncogenic features, namely saturation density and IL-3-independence of the growth of NIH 3T3 or BaF/3 cells, respectively, slight increases owing to the I777M mutation were observed, without reaching statistical significance.

Expression of p110-delta-I777M in Ramos and Ba/F3 cells maintained pAKT levels at more than 100-fold higher idelalisib concentrations than p110-delta-wt, but had little impact on cell growth and survival. In contrast, the anti-IgM-induced secretion of the chemokines CCL-3, CCL-4 and TNF-alpha by Ramos cells, which was strongly inhibited by idelalisib, was fully reconstituted by expression of p110-delta-I777M. Similarly expression of p110-delta-I777M partially rescued the chemotaxis of Ba/F3 cells to the chemokine CXCL-12 from inhibition by idelalisib as well as their migration independently of chemo-attractant.

Thus, p110-delta is less involved in cell autonomous functions of malignant B-cells than in their interactions with the microenvironment, exemplified by chemokine secretion and migration.

Zusammenfassung

Der Krankheitsverlauf von bösartigen Erkrankungen der B-Zellen hängt in großem Ausmaß von der B-Zellrezeptor Signalkaskade ab. Diese Schwachstelle wird in diesem Fall durch den zielgerichteten PI3K-delta Inhibitor Idelalisib ausgenutzt, der klinisch verwendet wird. Mit dem Ziel, zur Aufklärung der Wirkmechanismen von Idelalisib und anderer PI3K Inhibitoren durch die Beurteilung quantitativer, zielgerichteter Beiträge ihrer Wirksamkeit gegen spezifische onkogene Funktionen beizutragen, wurden Mutationen in die Bindetasche der p110-delta Kinase eingefügt, um eine Inhibitorresistenz zur Nutzung als chemisch genetische Werkzeuge zu vermitteln. Orientiert an der Struktur-Ähnlichkeit mit bekannten Resistenzmutanten der homologen p110-alpha Isoform, wurden durch zielgerichtete Mutagenese die p110-delta-I777M und -I825V zur Expression in Zelllinienmodellen hergestellt.

Bei Expression in Fibroblasten und malignen B-Zellen führte eine dieser Mutanten, p110-delta-I777M, einerseits zu einer gesteigerten Phosphorylierung der Proteinkinase AKT am Serin 473 und schützte andererseits die intrazellulären pAKT-Spiegel vor einer Reduzierung durch Idelalisib verglichen mit gleich stark exprimiertem Wildtyp, während p110-delta-I825V eine verringerte Aktivität aufwies. Im Vergleich zum Wildtyp unterstützte die neu, gentechnisch erzeugte p110-delta-I777M Mutante onkogene Zellfunktionen wie zum Beispiel verankerungs-unabhängiges Wachstum der NIH 3T3 Zellen, durch den B-Zellrezeptor induzierte CCL-3 Sekretion durch Ramos-Zellen und Wanderung von Ba/F3-Zellen zu CXCL-12, allerdings deutlich weniger als p110-alpha-H1047R mit bekannten onkogenen Eigenschaften. Für weitere untersuchte onkogene Eigenschaften, nämlich die Wachstumsdichte von NIH 3T3 Zellen, beziehungsweise die IL-3-Unabhängigkeit von Ba/F3 Zellen, wurden geringfügige Steigerungen aufgrund der I777M Mutation beobachtet, ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

Die Expression von p110-delta-I777M in Ramos und Ba/F3 Zellen hielt die AKT-Phosphorylierung bei mehr als 100-fach höheren Idelalisib-Konzentrationen aufrecht als die von p110-delta Wildtyp, hatte aber nur leichten Einfluss auf das Zellwachstum und das Überleben. Im Gegensatz dazu wurde die durch anti-IgM induzierte Sekretion der Chemokine CCL-3, CCL-4 und TNF-alpha in Ramos Zellen, die durch Idelalisib stark gehemmt wird, durch die Expression von p110-delta-I777M vollständig wieder hergestellt. In ähnlicher Weise wurde

die Wanderung von Ba/F3 Zellen zum Chemokin CXCL-12 vor Hemmung durch Idelalisib teilweise durch die p110-delta-I777M geschützt, ebenso wie die von CXCL-12 unabhängige Wanderung.

Folglich ist p110-delta weniger am zellautonomen Wachstum und Überleben von B-Zellen beteiligt als an deren Dialog mit dem Mikromilieu, z.B. durch Chemokin-Sekretion und Migration.