

Investigation of Functional Consequences of Mutations in the Splicing Factor SF3B1 and their Relevance for the Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Anja Königs

aus Duisburg

Köln

2021

Zusammenfassung

Chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist zusammen mit akuter myeloider Leukämie eine der häufigsten Form von Leukämie bei Erwachsenen der westlichen Welt. Somatische Mutation treffen am häufigsten das *Splicing Factor 3B Subunit 1 (SF3B1)* Gen und „hot spot“ Mutationen häufen sich im C-Terminus, welcher aus 20 Wiederholungen des Motifs Huntigton Elognation Factor 3 PR65A TOR (HEAT) besteht. Die häufigste Mutation ist eine heterozygote Aminosäuresubstitution von Lysin zu Glutaminsäure an Position 700 und ist mit verminderten Überlebenschancen von Patienten assoziiert. Während des Spleißprozesses bindet SF3B1 an den „branch point“ und ist notwendig für die korrekte Erkennung der 3' Spleißseite. Die Zielstellungen des Projektes waren die Identifizierung (1) von neuen SF3B1 Interaktionspartnern, (2) von veränderten Interaktionen in Folge der Mutation und (3) deren funktionale Charakterisierung. Darum wurden co-Immunopräzipitationen (co-IP) von SF3B1 in Wildtyp und mutierten (SF3B1^{+K700E}) K562 Zellen durchgeführt. Interaktionspartner von SF3B1 wurden mit Hilfe einer Massenspektrometrie analysiert und Versuche wurden unter normalen Wachstumsbedingungen sowie unter Hitzeschock durchgeführt. Hitzeshock wurde als Modell für proteotoxischen Stress während der Krebserkrankung gewählt um zu testen, ob die Mutation die Fähigkeit auf Stress zu reagieren, verändert. Bei den normalen Wachstumsbedingungen wurde zusätzlich zum Zelllysate der gesamten Zellen eine Fraktionierung in Nukleoplasma und Chromatin durchgeführt um Interaktionspartner von SF3B1 zu unterscheiden, die im post-transcriptionalen (Nukleoplasma) und co-transcriptionalen Spleißen (Chromatin) eine Rolle spielen.

Die MS Analyse konnte eine bis jetzt unbekannte Interaktion von SF3B1 mit dem aminoacyl-tRNA Synthetase (aaRS) multi-Enzym Komplex zeigen. Diese Interaktion war insbesondere im Nukleoplasma angereichert, wurde aber auch im Zelllysate der gesamten Zellen detektiert, wohingegen sie im Chromatin nicht vorhanden war. Validierungen mit Hilfe von co-IPs auf einem Western Blot konnten die Interaktion von SF3B1 zu tRNA Synthetase Arginyl-TRNA Synthetase 1 (RARS), Lysyl-TRNA Synthetase 1 (KARS) und Aspartyl-TRNA Synthetase 1 (DARS) bestätigen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass RARS im Nukleus mit „splicing speckles“ co-lokalisiert, welche vermehrt Spleißfaktoren im Nukleus enthalten. Analysen der Bindestelle von SF3B1 zu RARS und KARS zeigten, dass die N-terminale Region von Aminosäure 223-462 für eine Interaktion ausreicht obwohl die Mutation im C-terminalen Bereich liegt.

Die bestbeschriebene Funktion des aaRS multi-Enzym ist die Beladung von tRNAs für die Translation. Darum wurde die Translation mit Hilfe von Polysomprofilen und Puromycinblock analysiert. Diese Methoden deuten auf einen Translationsdefekt in SF3B1 mutierten Zellen hin. Des Weiteren wurde die Beladung der tRNAs mit Hilfe eines Mikroarrays gemessen, und zeigt, dass SF3B1 mutierte Zellen im Vergleich zum Wildtyp mehr geladene tRNAs enthalten. Die Anhäufungen von beladenen tRNAs wird mit verminderter Translation assoziiert und stützt damit die Ergebnisse einer defekten Translation. Zusammenfassend weisen die Analysen auf eine subtile aber reproduzierbare Verminderung in der Translation hin, wenn die K700E Mutation in SF3B1 vorhanden ist. Eine defekte Translation ist meistens mit einer geringeren Proliferation assoziiert und steht damit auf den ersten Blick im Kontrast zur verminderten Lebenserwartung bei Patienten mit einer SF3B1 Mutation. Neuere Studien zeigten jedoch, dass auch Translationsdefekte ohne erhöhte Proliferation zu toxischeren Effekten bei der Krebsentwicklung führen können.

Diese Studie zeigt eine bis jetzt unbekannt Verbindung von SF3B1 und wichtigen Mitgliedern des Translationsprozesses. Die Ergebnisse weisen auf eine bis jetzt unbekannt Funktion von SF3B1 bei der Translation hin. Dies könnte auf eine mögliche Rückkopplung und damit engere Verbindung von Spleißen und Translation hindeuten und ermöglicht womöglich neue Behandlungsstrategien.

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most prevalent forms of leukemia in adults. One of the most frequently mutated genes in CLL is the *Splicing Factor 3B Subunit (SF3B1)*, which is associated with poor prognosis. Hot spot mutations cluster in the C-terminal HEAT (Huntington Elongation Factor 3 PR65A TOR) repeats and the most prevalent mutation is a heterozygous amino acid substitution at position 700 from lysine to glutamic acid (K700E). During splicing, SF3B1 is involved in a recognition of the branch point of introns. My project aimed (1) to identify interaction partners of SF3B1 (2) to identify altered interactions due to *SF3B1* mutations and (3) to characterize their functional consequences. Therefore, I performed co-immunoprecipitations (co-IPs) of SF3B1, followed by mass spectrometry (MS) analyses using an isogenic cell line pair, K562, that was either wildtype for *SF3B1* or carried a heterozygous p.K700E mutation. To see whether the mutation affects the ability to react upon stress conditions, which models stress during cancer, I performed IPs under control and heat shock conditions. Furthermore, IPs under control conditions were performed in whole cell lysate as well as in nucleoplasm and chromatin fractions to analyze interaction partners of SF3B1 involved in post-transcriptional and co-transcriptional splicing, respectively.

Unexpectedly, the MS analysis revealed a previously unknown interaction of SF3B1 with the aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS) multienzyme complex in the nucleoplasmic fraction. The interaction was also observed in the whole cell lysate, although to a lesser extent and was absent in the chromatin fraction. This interaction was increased when the mutation was present. Subsequent validation experiments by co-IPs followed by western blot confirmed the interaction of SF3B1 with all members of the aaRS complex tested: Arginyl-TRNA Synthetase 1 (RARS), Lysyl-TRNA Synthetase 1 (KARS), and Aspartyl-TRNA Synthetase 1 (DARS). Moreover, analysis by immunofluorescence identified a co-localization of RARS with SF3B1. RARS also co-localized with splicing speckles, which are a nuclear storage for splicing factors. Mapping of the interaction site of RARS and KARS to SF3B1 showed that the SF3B1 N-terminal region between amino acid 223 and 462 was essential for the interaction, even though the K700E mutation is located further away in the C-terminal region.

AaRS multienzyme complex is involved in translation by charging of tRNAs, and therefore, an impact of the *SF3B1* mutation on translation was analyzed by polysome profiles (position/amount of ribosomes on RNA) and puromycin block assays (abortion of translation upon puromycin incorporation). With both methods, I found evidence for impaired translation in the mutant cells.

Moreover, the charging of tRNAs analyzed by microarray was increased in mutant cells leading to a reduced use of tRNAs in translation. Thus, a subtle but reproducible defect in translation was detected in mutant K562 cells.

SF3B1 mutations are associated with a poor prognosis in CLL patients. My project shows that the K700E mutation impairs translation, which is thought to be upregulated in more aggressive cancer forms. However, recent experiments revealed that cancers do not necessarily need to upregulate translation and proliferation to be more aggressive in the patient.

Our study provides insight into a potential new role of SF3B1 in translation which might point to new treatment options for patients with *SF3B1* mutation. The results presented here point to a tight cross talk between splicing and translation processes, both possibly regulated by SF3B1.