



Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Swiss Federal Institute of Technology Zurich



Institute of Molecular
Health Sciences

Diss.-No. ETH 21250

pVHL-Dependent MicroRNA Signaling in the Regulation of Chromosome Instability

A dissertation submitted to
ETH ZURICH
for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

MICHAEL PETER HELL

Dipl.-Chem. Univ., Technische Universität München

born January 23, 1985
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wilhelm Krek

Prof. Dr. Matthias Peter

Prof. Dr. Erich A. Nigg

2013

1. Abstract/Zusammenfassung/Sommaire

1.1. Abstract

Chromosome missegregation can lead to chromosome instability and aneuploidy, which is the deviation from the normal chromosome number and a commonly observed feature of many cancer types. This work investigates a potential occurrence of aneuploidy and its consequences in kidney cancer on a mechanistic and functional level *in vitro* and *in vivo*. Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) constitutes the major form of kidney cancer and is genetically tightly linked to loss of the von Hippel-Lindau (*VHL*) tumor suppressor gene. Its protein product, pVHL, has multiple functions in suppressing ccRCC development, including the degradation of the hypoxia inducible factor α (HIF α) transcription factors, thereby preventing e. g. reprogramming of cellular metabolism or induction of angiogenesis. Recently, our laboratory linked *VHL* loss to chromosome instability *in vitro* via reduced expression of the spindle checkpoint protein Mad2 (Mad2L1). However, the underlying mechanism and its relevance for ccRCC development remained unknown.

Here, we present that pVHL affects Mad2 in a non-canonical way through controlling translation initiation of Mad2 via its 3' untranslated region (3'UTR). Subsequently, we identified the microRNA miR-28-5p as a novel regulator of Mad2, which is upregulated upon *VHL* loss in cultured cells, in kidneys of *Vhl* ^{Δ/Δ} mice, and ccRCC patients. We could identify the binding site of miR-28-5p on the Mad2 3'UTR and show that its mutation leads to loss of pVHL-dependent Mad2 3'UTR regulation. Furthermore we show that miR-28-5p is necessary and sufficient to generate aneuploidy by spindle checkpoint weakening. Importantly, the inhibition of miR-28-5p restores the checkpoint, which could potentially lead to a therapeutic approach in ccRCC. In line with this, we show that ccRCC samples show aneuploidy, whose levels correlate with miR-28-5p expression across tumor grades. In order to further study the effect of chromosome instability *in vivo*, we established two mouse models.

We proved that *Vhl* loss in the kidney is leading to an increased frequency of chromosome missegregation by performing a surgical procedure inducing reversible ischemic kidney injury. Additionally, we observed the occurrence of cystic and dysplastic precancer lesions in a genetically defined, kidney-specific knockout model (*Vhl*^{Δ/Δ}*Mad2*^{Δ/+}). Taken together, these results suggest a novel mechanism of aneuploidy suppression via a pVHL-regulated microRNA pathway with potential contribution to kidney cancer development.

1.2. Zusammenfassung

Eine fehlerhafte Zellteilung kann zu chromosomaler Instabilität und Aneuploidie, einer Abweichung von der normalen Chromosomenanzahl, führen, was viele Krebsarten charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wird ein mögliches Auftreten von Aneuploidie und deren Auswirkungen auf die Nierentumor-Entwicklung mechanistisch und funktionell im Zellkultur- und Mausmodell untersucht. Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist die Hauptform von Nierenkrebs und genetisch eng mit dem Verlust des Tumorsuppressor-Gens *VHL* (von Hippel-Lindau) verknüpft. Dessen Proteinprodukt, pVHL, erfüllt mehrere krebshemmende Funktionen, wie z. B. den Abbau der HIF-Transkriptionsfaktoren (hypoxia inducible factor), was die Aktivierung der Angiogenese und eine Umprogrammierung des Metabolismus verhindert. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *VHL* auch zu einer reduzierten Expression des Mad2 (Mad2L1) Proteins führt, was im Zellkulturmodell Aneuploidie auslöste. Der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus sowie die Relevanz für die Entwicklung von Nierenkrebs wurden jedoch bislang nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass pVHL Mad2 nicht durch einen bereits bekannten Mechanismus reguliert, sondern die Initiation der Translation von Mad2 über dessen 3' untranslatierte Region (3'UTR) kontrolliert. Wir haben eine microRNA, miR-28-5p, identifiziert, welche die 3'UTR von Mad2 bindet und die Mad2-Expression verringert. MiR-28-5p und dessen primäres Transkript ist bei Verlust von *VHL* im Zellkultur- und Mausmodell sowie in Nierenkrebsbiopsien erhöht. Die Bindungsstelle von miR-28-5p in der Mad2 3'UTR konnte *in silico* und experimentell nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Mad2 3'UTR mit einer deaktivierten miR-28-5p Bindungsstelle nicht von pVHL reguliert werden kann. Des Weiteren demonstrierten wir, dass miR-28-5p notwendig und ausreichend für die Entstehung von Aneuploidie durch Schwächung des Spindelkontrollpunkts ist. Die Inhibition von miR-28-5p erlaubt, den Aneuploidie induzierenden Effekt anzuhalten. Dies könnte potentiell Anwendung in der Therapie von Nierenkrebs finden, denn wir zeigen auch, dass klarzelliger Nierenkrebs Aneuploidie entwickelt, was mit der

Expression von miR-28-5p stratifiziert nach Tumorgrad korreliert. Um den Effekt von Aneuploidie eingehender *in vivo* zu studieren, haben wir zwei Mausmodelle entwickelt. Es gelang uns in der Mausniere mit Hilfe einer operativ induzierten ischämischen Schädigung vermehrt Chromosomenfehlteilungen in *Vhl*-negativen Nierenzellen nachzuweisen. In einem genetischen, nierenspezifischen Mausmodell (*Vhl*^{Δ/Δ}*Mad2*^{Δ/+}) konnten wir die Entwicklung von zystischen und dysplastischen Krebsvorstufen unter dem Einfluss von Aneuploidie beobachten. In der Zusammenfassung zeigt diese Arbeit einen neuartigen, microRNA-abhängigen Mechanismus auf, der für die Entwicklung von Aneuploidie relevant ist und mutmasslich zur Entwicklung von *VHL*-negativem Nierenkrebs beiträgt.

1.3. Sommaire

Des erreurs durant la division cellulaire peuvent conduire à une instabilité chromosomique et ainsi à l'aneuploïdie, une déviation du nombre normal des chromosomes, caractérisant de nombreux types de cancer. Ce travail étudie une éventuelle apparition de l'aneuploïdie et ses conséquences dans le cancer du rein à un niveau mécanistique et fonctionnel *in vitro* et *in vivo*. Le carcinoma du rein à cellules claires (ccRCC) est la forme principale du cancer du rein et est génétiquement étroitement liée à la perte du gène suppresseur de tumeurs von Hippel-Lindau (*VHL*). Son produit protéique, pVHL, assume des fonctions multiples, qui préviennent le développement d'un cancer. Parmi elles, la dégradation des facteurs de transcription HIF (hypoxia inducible factor), ce qui empêche l'activation de l'angiogenèse et une reprogrammation du métabolisme. Récemment, le groupe Krek a montré que la perte de *VHL* mène à l'instabilité chromosomique *in vitro* par une expression réduite de la protéine Mad2 (Mad2L1). Cependant, le mécanisme sous-jacent et sa pertinence dans le contexte du développement du ccRCC restent inconnus.

Nous présentons ici que pVHL affecte Mad2 d'une manière non-canonique en contrôlant l'initiation de la traduction de Mad2 via la région non traduite en 3' (3'UTR). Par la suite, nous avons identifié le microARN miR-28-5p comme un régulateur potentiel de Mad2, qui est augmenté en cas de perte de *VHL* dans des cellules en culture, dans les reins de souris *Vhl*^{ΔΔ}, et des biopsies de cancer du rein. Nous avons pu identifier le site de liaison de miR-28-5p sur le 3'UTR de Mad2 et montrer que sa mutation entraîne une perte de régulation par pVHL. En outre, nous montrons que miR-28-5p est nécessaire et suffisant pour générer de l'aneuploïdie par l'affaiblissement du point de contrôle mitotique. Il est également important de noter que l'inhibition de miR-28-5p permet d'arrêter le développement d'aneuploïdie ce qui pourrait potentiellement conduire à une approche thérapeutique. En effet nous montrons aussi que le cancer du rein à cellules claires développe de l'aneuploïdie, dont l'ampleur à travers les grades du tumor est en corrélation avec l'expression de miR-28-5p. Afin d'étudier l'effet de l'aneuploïdie plus en détail *in vivo*, nous avons

développé deux modèles murins. Nous avons réussi à démontrer que la perte de *VHL* dans le rein conduit à une augmentation de la fréquence des ségrégations chromosomiques anormales à l'aide d'une lésion ischémique induite chirurgicalement. En outre, nous avons pu observer l'apparition de lésions précancéreuses kystiques et dysplasiques dans les reins sous l'influence de l'aneuploïdie dans un modèle génétique ($Vhl^{\Delta/\Delta}Mad2^{\Delta/+}$). Pris ensemble, ces résultats suggèrent un nouveau mécanisme de suppression d'aneuploïdie par une voie dépendante d'un microARN régulé par pVHL avec une contribution potentielle dans le développement du cancer du rein.