



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The effects of breast cancer therapy on estrogen receptor signaling throughout the body

Droog, M.

Citation

Droog, M. (2017, June 8). *The effects of breast cancer therapy on estrogen receptor signaling throughout the body*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/49509>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/49509>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/49509> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Droog, Marjolein

Title: The effects of breast cancer therapy on estrogen receptor signaling throughout the body

Issue Date: 2017-06-08

Addendum

Nederlandse Samenvatting

Waar gaat dit proefschrift over?

In dit proefschrift worden enkele aspecten van borstkankerbehandeling beschreven, waarbij de nadruk ligt op hormonale therapieën in relatie tot de oestrogeenreceptor. Zo'n driekwart van alle borstkankers in vrouwen van Europese afkomst brengt de oestrogeenreceptor tot expressie. Activatie van de oestrogeenreceptor gebeurt onder andere door middel van hormonen genaamd oestrogenen. Oestrogenen worden in pre-menopausale vrouwen vooral aangemaakt door de eierstokken, maar ook zoals in post-menopausale vrouwen, door andere weefsels waaronder vetcellen. Deze weefsels bevatten bepaalde cytochroom P450 enzymen (aromatases) die het hormoon testosteron omzetten in oestrogeen.

Het bloed vervoert de oestrogenen, welke vervolgens door celmembranen kunnen diffunderen. In de cel bindt oestrogeen aan de oestrogeenreceptor, die daarna het DNA bindt om genregulatie te beïnvloeden, hetgeen leidt tot celdeling. Omdat de oestrogeenreceptor ontvankelijk is voor sturing van buitenaf de cel, is het een ideaal doelwit voor anti-borstkankerbehandeling. Clinici proberen via hormonale therapieën die oestrogeensignalen te verstoren. Zogenaamde aromatase remmers zijn een vorm van hormonale therapie die zich richt op het blokkeren van aromatases waardoor testosteron niet meer in oestrogeen wordt omgezet. Wanneer er geen oestrogeen is om de oestrogeenreceptor te activeren, dan stopt celdeling, oftewel dan stopt de tumorgroei (alhoewel er ook hormoon-onafhankelijke manieren zijn om de oestrogeenreceptor te activeren). Andere hormonale borstkankertherapieën zijn anti-oestrogenen die concurreren met oestrogeen om de oestrogeenreceptor te binden. Eén van de meest succesvolle anti-oestrogenen is tamoxifen. Wanneer tamoxifen bindt aan de oestrogeenreceptor, kan de oestrogeenreceptor geen oestrogeen meer binden want het bindingsplekje is dan bezet.

Als de oestrogeenreceptor tamoxifen bindt in plaats van oestrogeen, dan bindt de oestrogeenreceptor vervolgens nog steeds aan het DNA maar het netto effect van genregulatie verandert waardoor borstkankercellen stoppen met delen. Veel borstkankerpatiënten hebben baat bij deze behandeling. Er zijn echter ook vrouwen die nadelige neveneffecten ondervinden.

Wat zijn de gevolgen van tamoxifen, en wat hebben wij ontdekt?

De meest voorkomende klacht van tamoxifen is opvliegers, maar het meest alarmerende is dat een klein aantal vrouwen endometriumkanker ontwikkelt door deze borstkankerbehandeling. Borstkankerbehandeling zoals tamoxifen kan dus effect hebben op andere weefsels dan borst.

Zoals hierboven beschreven, kan de oestrogeenreceptor het DNA binden. Tot nu toe is het DNA-bindingsprofiel van de oestrogeenreceptor met name in borstkanker in kaart gebracht. Dit komt vanwege de hoge incidentie en sterftcijfers van borstkanker onder vrouwen. Maar de oestrogeenreceptor komt ook tot expressie in andere weefsels, waaronder het endometrium, de botten, en de hersenen. **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift beschrijft de gevolgen van borstkankerbehandeling, en met name van tamoxifen, op de DNA-bindende capaciteiten van de oestrogeenreceptor in meerdere weefsels van het lichaam.

In **hoofdstuk 2** onderzochten wij de verschillen in oestrogeenreceptorbindingsprofielen aan het DNA, tussen twee groepen endometriumkankerpatiënten. De eerste groep endometriumkankerpatiënten had voorheen borstkanker gehad waarvoor zij tamoxifen behandeling hebben gekregen. De tweede groep endometriumkankerpatiënten heeft voorheen borstkanker gehad, maar ontvingen daar geen tamoxifen voor.

In deze studie namen wij waar dat er DNA bindingsplekken zijn waar het gemeten oestrogeenreceptorsignaal in sterkte verschilt tussen deze twee groepen. Deze DNA bindingsplekken associeerde tevens met verschil in genexpressie. Hiermee toonden wij aan dat het mogelijk is om nieuwe subtypes te onderscheiden in tumoren op het niveau van genregulatie.

Naar aanleiding van deze resultaten, zijn we op deze plekken op het DNA het oestrogeenreceptorsignaal gaan analyseren in borstkankers. De oestrogeenreceptor bindt voornamelijk enhancers (DNA elementen die transcriptie bevorderen), hetgeen voorheen beschreven is te verschillen in activiteit tussen weefsels. Hier tonen wij juist aan dat enhancergebruik door de oestrogeenreceptor veel gelijkenis vertoont tussen borstkanker en tamoxifen-geassocieerde endometriumkanker, terwijl dit minder het geval is tussen borstkanker en endometriumkanker van vrouwen die geen tamoxifen gebruikten.

In **hoofdstuk 3** vergeleken wij de DNA-bindingsprofielen van de oestrogeenreceptor tussen tamoxifen-geassocieerde endometriumtumoren met borstkankertumoren. Wij namen hier waar dat de oestrogeenreceptor in beide type kankers DNA bindt op plekken waar ook de zogenaamde pionier factor FOXA1 bindt. Als pionierfactor kan FOXA1 chromatine (het DNA met alle gebonden eiwitten en RNA) toegankelijk maken voor andere eiwitten om te binden. Zonder FOXA1 zouden veel plekken op het DNA onbereikbaar zijn voor de oestrogeenreceptor.

Naar aanleiding van deze bevindingen hebben we gekeken naar de ontwikkeling van endometriumkanker na borstkanker. Vrouwen die wel tamoxifen gebruikten in de behandeling van borstkanker hebben we hier onderscheiden van vrouwen die geen tamoxifen hebben gebruikt

tegen borstkanker. De tijd tussen borst- en de endometriumkanker was aanzienlijk langer in tamoxifen-gebruikers waar zowel FOXA1 als de oestrogeenreceptor ontbraken in de endometriumtumor. Dit verschil was afwezig in de groep van patiënten die niet met tamoxifen behandeld werden tegen borstkanker. Dit onderzoek toont aan dat endometrium- en borstkanker veel homologie vertonen in de manier waarop de oestrogeenreceptor functioneert, ondanks dat deze weefsels anders reageren op tamoxifen.

Vanaf **hoofdstuk 4** richten wij ons op de effecten van tamoxifen in borstkanker in verband tot ATF-2. In een borstkankercellijn tonen wij aan dat verminderde expressie van ATF-2 associeert met groei-inhiberende effecten van tamoxifen, en dat tamoxifen fosforylatie induceert op het aminozuur Thr71 van ATF-2 (hetgeen nodig is voor transcriptie). In oestrogeenreceptor-positieve borstkankerpatiënten associeert fosforylatie van ATF-2-Thr71 met een langere ziektevrije overleving bij tamoxifen gebruik.

In **hoofdstuk 5** bespreken we de uitdaging om een biomarker die in het lab getest is, te introduceren in de kliniek. Er zijn onderzoekers die aan een labtafel werken zoals ik, en er zijn onderzoekers die patiënten behandelen. Ondanks dat we hetzelfde doel nastreven (de patiënt genezen), bestaat er een kloof tussen deze twee vakgebieden. De afgelopen decennia zijn er talloze biomarkers getest in het lab maar die kunnen lang niet allen getest worden in een klinisch onderzoek omdat patiëntenmateriaal een uitputbare bron is. In dit laatste hoofdstuk proberen wij daarom de klinische onderzoekers van advies te dienen in het selecteren van biomarkers om te testen in de kliniek, en zo wetenschappelijke ontdekkingen te vertalen naar klinische toepassingen in borstkankerbehandeling.

In **hoofdstuk 6** reflecteren we op de voorgaande hoofdstukken door de resultaten van ons onderzoek in een grotere context te plaatsen. Alhoewel de voordelen van tamoxifen bij het behandelen van borstkanker ruim opwegen tegen het verhoogde risico op endometriumkanker, zal inzicht in de schadelijke gevolgen van tamoxifen kunnen helpen bij het voorkomen dan wel behandelen van endometriumkanker na tamoxifen gebruik. Daarnaast zullen biomarkers die kunnen voorspellen of een vrouw baat heeft bij tamoxifen, helpen in het voorkomen van overbehandeling. Tot slot bespreken we ook de vragen die ons onderzoek juist heeft opgeroepen, en bespreken we de mogelijkheden om die te onderzoeken.

Nederlandse Curriculum Vitae

Marjolein Droog is geboren op 10 februari 1986 te Gouda. In 2005 behaalde zij haar VWO diploma op het Coenecoop College te Waddinxveen. Zij begon haar bachelor Hoger Laboratorium Onderzoek in 2006 te Leiden, en specialiseerde zich in de richting moleculaire biologie. Tijdens haar bachelor liep zij stage op het Leids Universitair Medisch Centrum in de groep van Prof.dr.ir. Sylvère van der Maarel onder begeleiding van dr. Antoine de Morrée. Hier karakteriseerde zij de genproducten van AHNAK in relatie tot de ziekte Limb Girdle spierdystrofie.

In 2009 behaalde zij haar bachelor diploma en begon in hetzelfde jaar de opleiding tot master: Biomoleculaire Wetenschappen, aan de Vrije Universiteit te Amsterdam. Tijdens haar eerste master-stage, in de groep van dr. Jan Kooter, identificeerde zij DNA demethylase-coderende transcripten in de plantensoort *Petunia hybrida*. Tijdens een tweede master-stage, bij Cancer Research UK, Cambridge Research Institute in de groep van dr. Adele Murrell onder begeleiding van dr. Lovorka Stojic, onderzocht zij PcG/MSK-gemedieerde trimethylatie van histon 3 op lysine 27 in combinatie met phosphorylatie op de naastliggende serine 28 in borstcellijnen. Voor deze stage kreeg zij een KWF en een Erasmus beurs.

Gedurende haar master maakte Marjolein kennis met het Nederlands Kanker Instituut tijdens een literatuurscriptie in de groep van dr. Fred van Leeuwen. Hier deed zij onderzoek naar de regulatie van histonen die zich buiten het chromatine bevinden. In 2011 behaalde zij haar master Cum Laude.

Sinds 1 november 2011 is zij als PhD student verbonden aan het Nederlands Kanker Instituut, in de werkgroep nucleaire receptoren van dr. Wilbert Zwart, waar het hier beschreven onderzoek werd uitgevoerd. Marjolein presenteerde de resultaten van haar promotieonderzoek op verscheidene nationale en internationale congressen. Hiervoor won zij meerdere prijzen, waaronder de prijs voor de beste poster tijdens Federation of European Biochemical Societies (FEBS) summer school: Nuclear Receptor Signalling in Physiology and Disease in 2013, de prijs voor de beste poster tijdens de Nuclear Receptor Research Network (NRRN) congres in 2014, en tenslotte won zij de prijs voor de beste poster tijdens het internationale PhD student Cancer congres in 2015.

English Curriculum Vitae

Marjolein Droog was born on February 10, 1986 in Gouda, the Netherlands. In 2005, she obtained her pre-university (VWO) high school degree at the Coenecoop College in Waddinxveen. In 2006, she started her bachelor 'Higher Laboratory Education' at the applied university in Leiden for which she specialized in molecular biology. During her bachelor she performed an internship in the group of Prof.dr.ir. Sylvère van der Maarel under supervision of dr. Antoine de Morrée. Here, she characterized gene products of AHNAK with regard to Limb Girdle Muscular Dystrophy.

In 2009, she received her bachelor degree and, in that same year, she started her masters education 'Biomolecular Sciences' at the VU University of Amsterdam. At the VU university she performed an internship under supervision of dr. Jan Kooter, where she identified DNA demethylase-coding transcript in the plant species *Petunia hybrida*. She performed her final internship at Cancer Research UK, Cambridge Research Institute in the group of dr. Adele Murrell under supervision of dr. Lovorka Stojic. Here she investigated breast cell lines for PcG/MSK-mediated trimethylation of histone 3 at lysine 27 in combination with phosphorylation of its neighbouring serine 28. She was supported by a KWF grant and an Erasmus grant for this internship.

During her master education, Marjolein got acquainted with the Netherlands Cancer Institute while she performed a literature scription, supervised by dr. Fred van Leeuwen. Here, she investigated the regulation of histones that are outside the chromatin. In 2011, she received her masters degree Cum Laude.

Since november 1th 2011 she has worked at the Netherlands Cancer Institute, in the group of nuclear receptors led by dr. Wilbert Zwart, which resulted in this thesis. She presented the results of her work at several conferences, both national and international. For this, she won multiple awards like best poster prize at the Federation of European Biochemical Societies (FEBS) summer school: Nuclear Receptor Signalling in Physiology and Disease in Spetses (Greece, 2013), best poster prize at the Nuclear Receptor Research Network (NRRN) conference in Antwerpen (Belgium, 2014), and finally, she won the best poster prize during the International PhD Student Cancer Conference in Machester (UK, in 2015).

Portfolio

Name: Marjolein Droog

PhD period: November 2011 – October 2016

PhD supervisors: Prof.dr. J.J.C. Neefjes and dr. W.T. Zwart

Conferences

Year	Organizer	Subject	Location	Presented
2016	CSHL ¹	Chromatin and Epigenetics	New York, USA	Poster
2015	EMBO ² EMBO ² CGC ³ NRRN ⁴	Chromatin and Epigenetics Nuclear structure and Dynamics Molecular and Cellular aspects of Cancer Nuclear Receptors	Heidelberg, Ge Sur la Sorgue, Fr Amsterdam, NL Leiden, NL	Poster Poster
2014	Keystone CGC ³ NRRN ⁴	Nuclear Receptors: Biological networks, Genome Dynamics and Disease Cellular Signaling and Cancer Therapeutics Nuclear Receptors	Taos, USA Amsterdam, NL Antwerpen, Be	Poster Poster prize
2013	FEBS ⁵ summer school BCG ³ & CGC ⁶ NRRN ⁴	Nuclear Receptor Signaling in Physiology and Disease Translational Cancer Genomics Nuclear Receptors	Spetses, Gr Amsterdam, NL Utrecht, NL	Talk & poster prize Poster Poster
2012	BCG ³ & CGC ⁶ NRRN ⁴	Molecular mechanisms in Cancer Nuclear Receptors	Amsterdam, NL Leuven, Be	
2011	BCG ³ & CGC ⁶ NRRN ⁴	Epigenetics and noncoding RNA Nuclear Receptors	Amsterdam, NL Amsterdam, NL	

¹CSHL: Cold Spring Harbor Laboratories;

²EMBO, European Molecular Biology Organization;

³CGC, Cancer Genome Centre;

⁴NRRN, Nuclear Receptor Research Network;

⁵Federation of European Biochemical Societies;

⁶BCG, Centre for Biomedical Genetics

Retreats

Year	Organizer	Location	Pre-sented
2015	International PhD student Cancer Conference	Manchester, UK	Poster prize
2014	Zwart laboratory	Haarlem, Be	Talk
Annual	Department C2 Molecular Pathology Oncology Graduate school Amsterdam	Schoorl/Heemskerk/ Egmond aan Zee, NI Ermelo/Renesse, NI	Talk Pos- ter+Talk

Courses

Year	Organizer	Subject
2016	Stanford Online	Writing in the Sciences
2015	edX ¹	Statistics and R for the Life Sciences
2014	edX ¹	Foundations of Data Analysis
2013	Oncology Graduate school Amsterdam	English Writing and presenting in Biomedicine
2012	Oncology Graduate school Amsterdam Oncology Graduate school Amsterdam	Cancer genome and proteome: analysis, mining, and drug target screening Basic Medical Statistics

¹edX: massive open online course provider and online learning platform

Supervising students

Student	Level of education	University	Time
Ghazal Kebi	Master internship: Biomedical Sciences	University of Amsterdam	6 months
Nienke Haverkate	Bachelor internship: Applied Biological Sciences	University of Applied Sciences, Groningen	5 months
Mark Mensink	Master review: Oncology	University of Amsterdam	2 months

List of publications

M. Droog*, E. Nevedomskaya*, G.M.H.E.Dackus, R. Fles, Y. Kim, H. Hollema, G. Dackus, H. Hollema, M. Mourits, P. Nederlof, H. van Boven, S. C. Linn, F.E. van Leeuwen, L.F.A. Wessels, W. Zwart,
Estrogen Receptor α Wields Treatment-specific Enhancers between Morphologically Similar Endometrial Tumors.

Proc Natl Acad Sci U S A 114 (2017) E1316-E1325

M. Droog, M. Mensink, W. Zwart,
The Estrogen Receptor α Cistrome Beyond Breast Cancer.
Molecular endocrinology, me20161062 (2016)

M. Droog, E. Nevedomskaya*, Y. Kim, T*. Severson, K. D. Flach, M. Opdam, K. Schuurman, P. Gradowska, M. Hauptmann, G. Dackus, H. Hollema, M. Mourits, P. Nederlof, H. van Boven, S. C. Linn, L. Wessels, F. E. van Leeuwen, W. Zwart,
Comparative Cistromics Reveals Genomic Cross-talk between FOXA1 and ER α in Tamoxifen-Associated Endometrial Carcinomas.

Cancer research 76, 3773-3784 (2016)

T. M. Severson, E. Nevedomskaya, J. Peeters, T. Kuilman, O. Krijgsman, A. van Rossum, **M. Droog**, Y. Kim, R. Koornstra, I. Beumer, A. M. Glas, D. Peeper, J. Wesseling, I. M. Simon, L. Wessels, S. C. Linn, W. Zwart,
Neoadjuvant Tamoxifen Synchronizes ER α Binding and Gene Expression Profiles Related to Outcome and Proliferation.

Oncotarget 7, 33901-33918 (2016)

W. Zwart*, K. D. Flach*, B. Rudraraju*, T. M. Abdel-Fatah, O. Gojis, S. Canisius, D. Moore, E. Nevedomskaya, M. Opdam, **M. Droog**, I. Hofland, S. Chan, J. Shaw, I. O. Ellis, R. C. Coombes, J. S. Carroll, S. Ali, C. Palmieri,

SRC3 Phosphorylation at Serine 543 Is a Positive Independent Prognostic Factor in ER-Positive Breast Cancer.

Clinical cancer research 22, 479-491 (2016)

B. Rudraraju, **M. Droog***, T. M. Abdel-Fatah*, W. Zwart, A. Giannoudis, M. I. Malki, D. Moore, H. Patel, J. Shaw, I. O. Ellis, S. Chan, G. N. Brooke, E. Nevedomskaya, C. Lo Nigro, J. Carroll, R. C. Coombes, C. Bevan, S. Ali, C. Palmieri,

Phosphorylation of Activating Transcription Factor-2 (ATF-2) within the Activation domain is a Key Determinant of Sensitivity to Tamoxifen in Breast Cancer.

Breast cancer research and treatment 147, 295-309 (2014)

M. P. Jansen, T. Knijnenburg, E. A. Reijm, I. Simon, R. Kerkhoven, **M. Droog**, A. Velds, S. van Laere, L. Dirix, X. Alexi, J. A. Foekens, L. Wessels, S. C. Linn, E. M. Berns, W. Zwart,
Hallmarks of Aromatase Inhibitor Drug Resistance Revealed by Epigenetic Profiling in Breast Cancer.

Cancer research 73, 6632-6641 (2013)

M. Droog, K. Beelen, S. Linn, W. Zwart,
Tamoxifen resistance: From Bench to Bedside.
European journal of pharmacology 717, 47-57 (2013)

A. de Morree, **M. Droog**, L. Grand Moursel, I. J. Bisschop, A. Impagliazzo, R. R. Frants, R. Klooster, S. M. van der Maarel,
Self-regulated Alternative Splicing at the AHNK Locus.
FASEB journal 26, 93-103 (2012)

* equal contribution

