



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Regulation of actomyosin contraction as a driving force of invasive lobular breast cancer

Schipper, K.

Citation

Schipper, K. (2020, December 3). *Regulation of actomyosin contraction as a driving force of invasive lobular breast cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/138484>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/138484>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138484> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Schipper, K.

Title: Regulation of actomyosin contraction as a driving force of invasive lobular breast cancer

Issue date: 2020-12-03

Nederlandse Samenvatting

Kanker wordt beschreven als een ziekte waarbij cellen oncontroleerbaar groeien en zich naar andere weefsels kunnen verspreiden. De oorsprong van deze ziekte ligt in de verstoring van cellulaire processen die bepalen hoe onze cellen functioneren, met name processen die betrokken zijn bij het stimuleren van celdeling en celoverleving. Deze verstoringen worden veroorzaakt door (epi) genetische veranderingen in zogenaamde ‘driver-genen’ die bij verandering kwaadaardige transformatie veroorzaken. Het is belangrijk om te weten welke driver-genen in een tumor zijn veranderd, omdat deze als doelwit voor therapeutische interventie kunnen dienen. De driver-genen die verantwoordelijk zijn voor kwaadaardige transformatie kunnen sterk verschillen van het ene tumor (sub) type naar het andere en zelfs binnen een specifiek subtype zijn er verschillen tussen individuele tumoren. De hoofdstukken in dit proefschrift beschrijven onderzoeken naar de driver-genen en cellulaire processen die nodig zijn voor de ontwikkeling en resistentie tegen geneesmiddelen van invasief lobulair carcinoom (ILC), een subtype van borstkanker waar 8-14% van alle gevallen van borstkanker onder vallen. Het meest veranderde driver-gen in ILC is *CDH1* (ook bekend als E-cadherin) dat in de meeste ILCs wordt geïnactiveerd. Muismodellen waar E-cadherine wordt geïnactiveerd in het borst epitheel hebben ons geleerd dat het verlies van E-cadherine alleen niet voldoende is om kanker te veroorzaken. Dit geeft aan dat extra driver-genen moeten worden gewijzigd om ILC te ontwikkelen. Met het onderzoek dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd, wilden we onze kennis vergroten van de driver-genen en cellulaire processen die ten grondslag liggen aan ILC-ontwikkeling en het ontstaan van resistentie tegen therapie.

In **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift hebben we een genetische screening-methode uitgevoerd om nieuwe driver-genen te identificeren die een rol spelen bij de ontwikkeling van ILC. Voor deze screen gebruikten we muizen waarin we inactivatie van E-cadherin combineerden met *Sleeping Beauty* transposon-gebaseerde insertiemutagenese (IM) in de borstklier. IM is een methode die genen willekeurig verandert. Als deze veranderde genen driver-genen zijn, zullen ze tumorvorming veroorzaken en hoe krachtiger deze veranderingen zijn, des te vaker zullen we ze vinden. De tumoren die ontstonden door gecombineerd verlies van E-cadherine en IM leken op ILC's van patiënten, wat aangeeft dat de driver-genen die verantwoordelijk zijn voor tumorinductie relevant zijn. Vier genen die vaak werden gevonden waren *Mypt1/2*, *Aspp2* en *Myh9*. Wat opmerkelijk was is dat deze genen

nooit samen gemuteerd waren wat een indicatie is van een gedeeld onderliggend mechanisme waarop ze ILC induceren. Van deze vier genen worden *Mypt2*, *Aspp2* en *Myh9* ook vaak gewijzigd in menselijke ILC's. We hebben gevonden dat voor *Mypt1/2* en *Aspp2*, de mutaties in deze genen leidde tot de expressie van getrunceerde eiwitten, terwijl de mutatie in *Myh9* een vermindering van de eiwitexpressie veroorzaakten. We hebben vervolgens gevalideerd dat expressie van deze truncatie-varianten van MYPT1 en ASPP2 of vermindering van het MYH9 eiwit voldoende is om ILC-vorming te induceren in combinatie met de inactivatie van E-cadherine.

Wat onduidelijk bleef uit de experimenten beschreven in **Hoofdstuk 2** was hoe de geïdentificeerde driver-genen samenwerken met de inactivatie van E-cadherin bij de ontwikkeling van ILC. We hebben deze vraag in **Hoofdstuk 3** behandeld. Om te onderzoeken welk cellulair proces moet worden gewijzigd om tumor vorming te initiëren borst-epitheelcellen waar E-cadherine geïnactiveerd is, hebben we een muismodel gemaakt waarbij het verlies van E-cadherine gekoppeld was aan de expressie van een fluorescerend eiwit. Dit muismodel stelt ons in staat om te kijken wat er gebeurt met cellen waar E-cadherin geïnactiveerd wordt. We hebben vastgesteld dat borstepitheelcellen (MEC's) die E-cadherine verliezen niet alleen naar lumen verdreven worden waar ze sterven door apoptose, maar ook in de andere richting naar het basale membraan. In tegenstelling tot de lumaal verdreven MEC's sterven de basaal verdreven MEC's niet af, maar zijn in staat om te overleven in het stroma dat de melkkanalen direct omringt. De basaal verdreven E-cadherine-deficiënte MEC's overleven weliswaar maar prolifereren niet, dit verklaart waarom E-cadherine-verlies alleen onvoldoende is om ILC te induceren. Analyse van deze basaal verdreven MEC's toonde aan dat ze vaak een verhoogde actomyosine contactiliteit hebben en niet kunnen hechten aan en overleven op vezelrijk collageen dat een veelvoorkomend extracellulaire matrixcomponent van ILC is. In plaats daarvan vertrouwen ze op hechting aan laminines om te overleven. We hebben vervolgens aangetoond dat vermindering van actomyosine-tractiliteit het mogelijk maakt dat basaal verdreven MEC's hechten aan en overleven op fibrillair collageen. Bovendien laten we zien dat expressie van getrunceerd MYPT1 resulteert in actomyosine-relaxatie die nodig is voor tumorvorming.

In **Hoofdstuk 4** laten we zien dat getrunceerd ASPP2, vergelijkbaar met getrunceerd MYPT1, ook actomyosine-relaxatie induceert die de overleving en groei van E-cadherine-deficiënte MEC's op stijve matrices

mogelijk maakt. We vroegen ons vervolgens af of actomyosine-relaxatie ook samenwerkt met de PI3-kinase-signalerings-route, die vaak wordt geactiveerd in ILC's. We hebben daarom een muismodel gegenereerd waar in de borstklier getrunceerd MYPT1 / ASPP2 tot overexpressie wordt gebracht en zowel E-cadherine als PTEN, wat een negatieve regulator van de PI3K-route is, geïnactiveerd worden. We vonden dat gecombineerde activering van de PI3K-route en actomyosine-relaxatie in E-cadherine-deficiënte MEC's resulteert in snellere ILC-vorming en grotere tumoren aan het einde van het experiment. We hebben vervolgens beoordeeld hoe ILC's aangedreven door actomyosine relaxatie in de loop van de tijd vorderen. We hebben vastgesteld dat ILC's aangedreven door getrunceerd MYPT1 zeer langzaam groeien, terwijl ILC's aangedreven door getrunceerd ASPP2 aanzienlijk sneller groeien. Vervolgens hebben we aangetoond dat deze toename in progressie te wijten was aan een andere functie van getrunceerd ASPP2, namelijk defosforylering van de transcriptiefactor YAP, die belangrijk is voor de groei van organen en vaak gedereguleerd is in kanker. We vonden dat activering van YAP door getrunceerd ASPP2 niet vereist is voor de initiatie van ILC, maar wel de groei en progressie van tumoren stimuleert.

Het meest veranderde gen in de IM screen beschreven in **Hoofdstuk 2** was Fibroblast Growth Factor Receptor (*FGFR*) 2. FGFR-remmers zijn ontwikkeld als geneesmiddelen tegen kanker, maar tumoren worden vaak resistent tegen deze remmers in de loop van de tijd. In **Hoofdstuk 5** hebben we IM gebruikt om te onderzoeken hoe tumoren die worden aangedreven door FGFR-signalering resistent worden tegen FGFR-remmers. Om dit de bewerkstelligen hebben we orthotopisch muizen-ILC's met insertiemutaties in *Fgfr2* getransplanteerd en deze tumoren behandeld met de FGFR-remmer AZD4547. Tumoren reageerden aanvankelijk goed en vertoonden regressie, maar alle tumoren werden uiteindelijk resistent tegen FGFR-remming. Om te identificeren hoe deze tumoren resistent waren geworden, voerden we transcriptomische analyse uit en bepaalden we welke transposon-inserties uniek waren of verrijkt in de resistente tumoren. Deze benadering leverde meerdere bekende en nieuwe mechanismen van FGFR-remmer resistentie op. De meeste resistentie-mechanismen resulteerden in de reactivering van de MAPK-ERK-signalerings-route waarvan bekend is dat deze proliferatie en overleving stimuleert. Van de ontdekte resistentie-mechanismen werden twee alleen geïdentificeerd door *de novo* transposon-inserties die het nut van insertiemutagenese benadrukken voor het identificeren van nieuwe

mechanismen van resistentie tegen anti-kanker therapieën.

In het laatste **Hoofdstuk 6** bespreek ik de belangrijkste bevindingen van het werk dat in dit proefschrift is beschreven, hoe deze bevindingen voortbouwen op eerdere studies en hoe ze bepaalde concepten op het gebied van ILC uitdagen.