



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Molecular understanding of tamoxifen resistance in breast cancer

Leeuw, R. de

Citation

Leeuw, R. de. (2012, February 9). *Molecular understanding of tamoxifen resistance in breast cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18458>

Version: Corrected 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/1887/18458>

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

Nederlandse samenvatting

List of publications

Curriculum vitae

Nederlandse samenvatting & discussie

Wereldwijd worden er jaarlijks 1,4 miljoen nieuwe diagnoses gesteld van borstkanker en komen bijna een half miljoen borstkankerpatiënten te overlijden aan de gevolgen van borstkanker. Ongeveer 70% van alle gevallen van borstkanker bevatten de oestrogeenreceptor en deze tumoren hebben oestrogenen nodig om te groeien. Patiënten met dit type borstkanker worden geopereerd en krijgen vaak bestraling. Daarnaast krijgen deze patiënten een extra behandeling om de kans op uitgroeiende metastasen te verkleinen. Dit wordt adjuvante endocrine (of hormonale) therapie genoemd. Deze hormonale therapie, welke onder te verdelen is in twee subklassen van medicijnen: aromataseremmers en anti-oestrogenen. Deze twee subklassen verschillen in werkingsmechanismen, maar bereiken hetzelfde effect: het blokkeren van de oestrogeenafhankelijke groei van tumorcellen. Aromataseremmers voorkomen de synthese van oestrogenen door het verantwoordelijke enzym, aromatase, te remmen en ontnemen de oestrogeenreceptor zodanig het natuurlijke ligand (hormoon). Omdat de oestrogeen receptor niet geactiveerd kan worden door het natuurlijke ligand, resulteert dit in een remming van tumorgroei. Anti-oestrogenen blokkeren de oestrogeenreceptor door te binden in de ligandbindende holte, waar normaal gesproken het oestrogeen zou binden. Door deze competitie met het natuurlijke ligand om dezelfde bindingsplek kan de oestrogeen receptor niet meer binden aan co-activatoreiwitten, die essentieel zijn voor de vorming van een actief transcriptie complex. Het gevolg van deze remming is dat tumorgroei ook geremd wordt.

Dit proefschrift gaat over het anti-oestrogeen dat het meest wordt toegepast in de kliniek, namelijk "tamoxifen", waarmee veel patiënten reeds succesvol zijn behandeld. Echter, niet iedereen heeft baat bij deze vorm van hormoontherapie en zien onverhoopt de kanker terugkeren. Het is essentieel om de onderliggende moleculaire biologie van tamoxifen resistentie bij borstkanker te bestuderen, opdat we deze kunnen vertalen naar relevante toepassingen voor de kliniek, zoals een assay om respons op tamoxifen te kunnen voorspellen vóór behandeling.

Omdat tamoxifen direct op de oestrogeenreceptor werkt, is het belangrijk om de functie van dit eiwit te onderzoeken en om te bepalen wat hiermee gebeurt bij resistentie tegen het medicijn. In Hoofdstuk 2 hebben we de verschillende subdomeinen waaruit de receptor bestaat bestudeerd, daarbij de vraag stellend welke rol(len) deze domeinen spelen in de functie van de oestrogeenreceptor na het binden van een ligand. De familie van oestrogeenreceptoren bestaat uit twee leden: oestrogeenreceptor alfa ($ER\alpha$) en beta ($ER\beta$). Als een borsttumor positief is voor de oestrogeen receptor, wordt normaliter gerefereerd naar het alfa subtype. $ER\alpha$ and $ER\beta$ zijn allebei nucleaire receptoren, die na het binden van een hormoon aan het DNA binden en bepaalde genen aan kunnen zetten, ook wel gentransactivatie genoemd. Ze verschillen echter zowel in klassieke gentransactivatie, waarbij de oestrogeenreceptor direct aan het DNA bindt, als in de non-klassieke gentransactivatie, waarbij ze samenwerken met andere transcriptiefactoren. Tevens vertonen ze verschil in bindingscapaciteit met cofactoren, hulpeiwitten die oestrogeenreceptor nodig heeft voor gentransactivatie. We hebben $ER\alpha$ and $ER\beta$ vergeleken om de individuele bijdragen van de verschillende domeinen te onderscheiden in hoe de receptor reageert op een ligand. Tussen de twee oestrogeenreceptoren is het DNA-bindende domein (DBD) het meest geconserveerd (96%). Dit domein kan een interactie aangaan met een oestrogeen responsief element (ERE) op het DNA, zodat de receptor vervolgens de expressie van een gen induceren. Het ligand bindende domein van beide receptoren is slechts voor 53% geconserveerd, wat zou kunnen verklaren dat er specifieke liganden bestaan voor óf $ER\alpha$ óf $ER\beta$. Dit verklaart echter niet waardoor $ER\alpha$ en $ER\beta$ juist geheel anders kunnen reageren op één en hetzelfde ligand, zoals

het geval is voor tamoxifen en oestradiol. In Hoofdstuk 2 laten we zien dat een groot deel van deze verschillen worden bepaald door het activatie functie domein 1 (AF-1) en het scharnier (hinge) domein, welke grotendeels verschillend zijn tussen ER α and ER β . We hebben deze domeinen uitgewisseld tussen ER α and ER β , wat de eiwitstructuur beïnvloedde, geobserveerd als intramoleculaire fluorescence resonance energy transfer (FRET) veranderingen. Het vervuilen van het scharnier of het AF-1 domein wisselde in ieder geval deels het specifieke gedrag van de oestrogeenreceptor subtypes: de ER α -kenmerkende interactie van het AF-1 domain met de coregulator SRC-1 en het recruterende van de transcriptie machinerie RNA polymerase II (bv. vóór of na ligand binding), waardoor gentransactivatie op het ERE wordt beïnvloed. Tevens wordt het effect op gentransactivatie uitgewisseld in een reporter assay met een niet-klassiek AP-1 motief. Als de oestrogeenreceptor indirect via andere factoren aan dit motief bindt, wordt een eenvoudig te meten reporter gen overgeschreven. Het scharnier en AF-1 domain lijken in synergie te werken met het activatie functie 2 (AF-2) domein en daarmee de functie van de oestrogeenreceptor te bepalen. Desalniettemin blijven sommigen vragen onbeantwoord. De ultieme controle voor dit moleculaire mechanisme die nog niet uitgevoerd is, is een gecombineerde uitwisseling van zowel het AF-1 en scharnier domain, of als alternatief alleen het AF-2 domain, wat in essentie op hetzelfde neerkomt. De verwachte uitkomst van deze proef zou een algehele uitwisseling zijn van oestrogeenreceptorfunctie voor de liganden die zowel ER α and ER β kunnen binden. Maar niet voor subtype-specifieke liganden: ER α heeft zowel het actieve AF-1 domain als het langere, flexibele scharnier nodig om tot zijn volledige oestradiol response te kunnen komen. Het ruilen van een klein deel van het scharnier blijkt onvoldoende, ook al is dit deel in ER α hoogst gevoelig voor post-translationele modificaties en daarmee een centraal knooppunt voor de functie van de receptor. Deze post-translationele modificaties, waaronder de fosforylering van het aminozuur Serine 305, beïnvloeden ER α functie, maar niet die van ER β na het uitwisselen van dit eiwitdeel. Toch detecteren we een verandering in structurele conformatie van het eiwit met FRET. Met deze techniek kunnen we de orientatie van het AF-1 en AF-2 domein bestuderen door aan de twee uiteinden van oestrogeenreceptor een verschillend kleurlabel te hangen: een donor fluorofoor (blauw) en een acceptor (geel). Als het donor label met een laser belicht wordt, zendt deze blauw licht uit. Als de acceptor echter dichtbij de donor komt door een verandering van eiwitstructuur, kan de donor zijn energie overdragen aan de acceptor, die daardoor geel licht af geeft ten koste van het blauwe signaal. Als de vouwing van het eiwit verandert, kunnen de labels dicht bij of verder van elkaar komen te staan. Een verandering in FRET is zo een maat voor verandering in receptorvouwing en op deze wijze hebben wij een verandering in eiwitvouwing gedetecteerd bij de uitwisseling van het kleine stukje scharnier domein. Ondanks dat we verschillen metten met FRET, bleek dit zich niet te vertalen in verschillen op gentranscriptie. Dit zou kunnen komen doordat de hinge van ER β korter is en minder flexibel dan die van ER α , wat minder ruimte laat om de AF-1 en AF-2 op een juiste manier te plaatsen om coregulators te kunnen werven en chromatine te binden. In dit geval blijkt FRET niet indicatief voor downstream gentransactivatie.

De verhouding tussen ER α and ER β zou bepalend kunnen zijn voor het success van endocriene therapie bij borstkanker: ER β zou oestrogeenafhankelijke groei tegengaan. Na het binden van een ligand dimeriseert de oestrogeenreceptor en bindt aan het DNA om genexpressie te induceren. Het maakt niet alleen dimeren met zichzelf, c.q. homodimeren (ER α :ER α and ER β :ER β), maar ook met het andere subtype, heterodimeren (ER α :ER β). Aangezien ER α and ER β verschillen in functie, zou dit kunnen betekenen dat ook de dimeren verschillen in functie. Dit blijkt inderdaad het geval: zowel ER β homodimeren and ER α :ER β gaan oestradiolafhankelijke groei van borstkankercellen tegen in een experimentele opzet. Aangezien het DNA-bindende domein tussen beide oestrogeenreceptoren voor 96%

geconserveerd is, zou je verwachten dat beide subtype receptoren op dezelfde plaatsen aan het chromatine kunnen binden, en daarmee hetzelfde “chromatine-bindingslandschap” hebben. Het zou echter kunnen dat andere eiwitdomeinen buiten het DNA-bindend domein ook een rol spelen in het positioneren van de oestrogeenreceptor op het DNA. Een suggestie hiervoor is beschreven voor een andere nucleaire receptor, PPAR, dat heterodimeriseert met RXR (PPAR:RXR). Het kristalstructuur laat zien dat het C-terminale helix-uiteinde van PPAR langs het DNA strekt. Dit zou kunnen betekenen dat de C-terminale helix van de oestrogeenreceptor een vergelijkbare synergetische rol samen met het DNA-bindende domein speelt in chromatine interactie. Al beschrijft één verhaal dat het chromatine-bindingslandschap overwegend gelijk is tussen ER α en ER β , waarbij ook overlappend genexpressie profiel te verwachten is, zou het toch interessant kunnen zijn om alle DNA-interacties in kaart te brengen van de ER hetero- en homodimeren middels re-ChIP-seq experimenten om te testen of ze chromatine-bindingsspecificiteit vertonen. Met deze techniek worden chromatinefragmenten in twee stappen geïsoleerd: eerst met een antilichaam tegen de ene receptor (c.q. ER α) en vervolgens met een antilichaam tegen het tweede (ER β), opdat slechts de DNA-fragmenten overblijven waaraan het heterodimeer bindt. Echter, de oorzaak van de functionele verschillen tussen de twee oestrogeenreceptoren lijkt niet te liggen in differentiële DNA interacties, aangezien het DNA-bindende domein zeer geconserveerd is. Waarschijnlijker is dat de variaties in AF-1 en scharnierdomein de structurele conformatie van de receptor veranderen en zo de binding van coregulatoreiwitten beïnvloeden.

Het recruteren van coregulatoren door de oestrogeenreceptor hebben we bekeken in Hoofdstuk 3. Dit is het eerste verhaal, waarin een high-throughput benadering wordt toegepast om binding van coregulatoren aan een volledige, endogene oestrogeenreceptor te meten. Deze benadering bestaat uit een platform (array), waarop peptidefragmenten van coregulatoreiwitten zijn bevestigd. Deze peptides bevatten een motief dat herkend en gebonden wordt door nucleaire receptoren: het LxxLL motief. In interactiestudies tussen coregulatoreiwitten en de oestrogeenreceptor wordt vaak alleen het ligandbindende domein tot overexpressie gebracht. In onze benadering resulteerde een volledige oestrogeen receptor, na behandeling met oestradiol, in een peptidebindingsprofiel wat hoogst vergelijkbaar was met dat van het ligandbindende domein alleen. Ook blijken verschillen door grote labels, zoals de eerder genoemde gele en blauwe fluoroforen, exogene overexpressie of juist endogene oestrogeenreceptor verwaarloosbaar voor peptide binding op deze array. Zelfs de celcontext blijkt van weinig invloed op het peptidebindingsprofiel, blijkend uit verwaarloosbare verschillen tussen endogeen eiwit in de MCF7 borstkankercellijn en overexpressie in de U2OS botkankercellijn. Zoals verwacht hebben liganden impact op cofactorinteracties: oestradiol versterkt binding met coregulatoren, terwijl tamoxifen deze interacties juist verzwakt. Na het testen van de toepasbaarheid van de peptide array voor oestrogeenreceptorfunctie, vroegen we ons af of we hiermee ook tamoxifenresistentie zouden kunnen meten. Een vorm van tamoxifen resistentie werkt via de fosforylering van de oestrogenreceptor op het Serine 305 (S305) residue door proteïne kinase A (PKA). Deze fosforylering leidt tot een structurele verandering van ER α , waarbij de oriëntatie tussen de receptor en de coactivator SRC-1 verandert, zodat SRC-1 niet alleen aan het AF-1, maar ook aan het AF-2 domain van ER α bindt. Dientengevolge wordt het transcriptiecomplex actief, als ER α tamoxifen heeft gebonden. De PKA-geïnduceerde conformationele verandering van ER α is mogelijk ook van invloed op de oriëntatie en bindingscapaciteit van andere coregulatoren, met als gevolg tevens de DNA interacties en genexpressie, wat uiteindelijk kan leiden tot meer celgroei. Op die manier kan tamoxifen werken als agonist, in plaats van antagonist, als ER α S305 gefosforyleerd is. Zo observeerden we op de peptide array inderdaad sterkere coregulatorbindingen bij tamoxifengebonden, S305 gefosforyleerde oestrogenreceptor, wat een meer actieve receptor

impliceert in deze tamoxifenresistente setting.

We detecteerden geen duidelijke coregulatorspecifieke veranderingen. Behandeling van de cellen met oestradiol of stimulatie van PKA, waardoor S305 gefosforyleerd wordt, resulteerden in een algehele verhoging van coregulatorbinding voor alle peptiden, die voor stimulatie al enige interactie vertoonden met ER α ligand. Ook veroorzaakte de verandering van receptorconformatie na ligandbinding geen nieuwe interacties met andere peptiden. Dit suggereert dat de conformatie op zichzelf niet verantwoordelijk is voor specificiteit in interacties met coregulatormotieven, maar dat er andere factoren hierbij een rol lijken te spelen. Mogelijkerwijs is het volledige coregulator eiwit nodig om specificiteit te verkrijgen. We weten bijvoorbeeld dat ER α een interactie aangaat met SRC-1 middels zowel het AF-1, als het AF-2 domain. Het AF-2 domein bindt het klassieke LxxLL motief, maar het AF-1 herkent een aminozuurregio van SRC-1 die rijk is aan glutaminen (Q-rijk domein). Deze tweede interactie kan niet gemeten worden in de peptide array, omdat de peptides alleen LxxLL(-achtige) motieven bevatten, en geen Q-rijk domein. Bij het ontbreken van een interactie tussen het ER α -AF-1 domein het coregulator-Q-rijk domein, welke specificiteit zou kunnen bepalen, kan het LxxLL-motief vrij binden na oestradiolbinding meer ruimte begrijp ik niet,,,,, of S305-fosforylering aan het bindingsoppervlak van het AF-2 domein, zonder sterische hinder van de rest van de coregulator. Dit kan wellicht de algeheel versterkte binding op de array zou kunnen verklaren.

Dat neemt niet weg dat de versterkte binding aan LxxLL-coactivatormotieven een indicatie is voor verhoogde activiteit van de oestrogeenreceptor. Het is opmerkelijk dat we dit effect zelfs kunnen meten met een enkele post-translationele modificatie: S305-fosforylering (S305-P). De receptor hoeft niet opgezuiverd te worden uit cellen, wat nogal problematisch kan zijn en waarbij een fosforylering makkelijk verloren kan gaan. Zelfs in tumorlysaten is een verhoogde ER α functie te detecteren, wanneer S305 gefosforyleerd is, wat in parallel bepaald is volgens immunohistochemische analyse. Wel zal een biochemische analyse zoals deze een detectielimiet hebben, waaronder het effect van S305-P niet meer te meten is, maar deze moet nog bepaald worden. Dientengevolge zal deze benadering niet toepasbaar blijken op tumoren met een zeer lage, doch positieve kleuring voor ER α S305-P of als slechts enkele cellen in de hele tumor positief zijn. In dat geval wordt het positieve S305-P signal teveel verdund door de rest van de tumor. Extraheren van tumorcellen uit het omliggende stroma en de normale (niet-tumor) cellen zou de detectie kunnen verbeteren, doordat zo de (gefosforyleerde) oestrogeenreceptor geconcentreerd wordt in het tumormonster. Om deze array te kunnen gaan toepassen in een klinische setting, moet eerst dit type technische vragen beantwoord worden in een uitgebreidere studie.

Een sterkere binding van ER α uit patiëntenmateriaal aan de peptide array suggereert een hogere basale activiteit van de oestrogeenreceptor, welke tamoxifenresistentie zou kunnen verklaren. De coregulator peptide array, die ER α meet, zou van toegevoegde waarde kunnen zijn in het voorspellen van hoe een patiënt zal reageren op tamoxifenbehandeling. Sterkere coregulatorbinding impliceert dat de oestrogeenreceptor gefosforyleerd is en dus resistent zal zijn tegen tamoxifen.

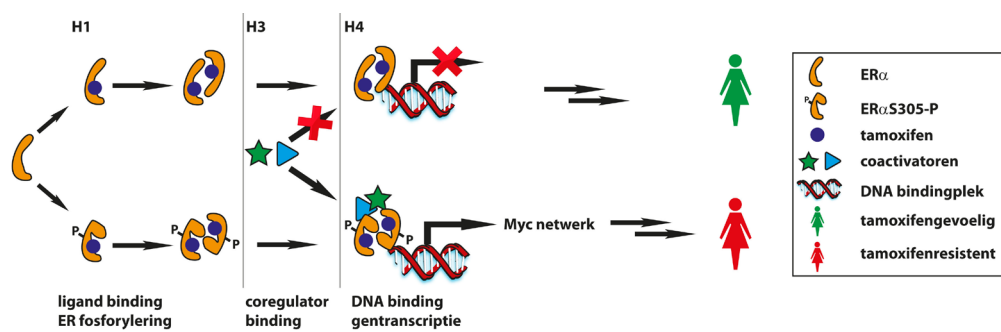
In de kliniek is fosforylering op ER α S305 gecorreleerd met slechter ziekteverloop in oestrogeenreceptor-positieve borstkanker bij patienten die met tamoxifen behandeld zijn. Een tot nog toe onbeantwoorde vraag is hoe de gefosforyleerde receptor, mogelijk via betere binding met coregulatoren, uiteindelijk leidt tot de groei van tumorcellen. In Hoofdstuk 4 hebben wij deze vraag benaderd middels een geïntegreerde analyse van het chromatinebindingslandschap en het genexpressieprofiel, of transcriptoom, over het volledige genoom van PKA-gefosforyleerd ER α . Deze enkele modificatie heeft een opvallend effect op chromatinebinding: normaliter bindt ER α het liefst aan motieven op afstand van genen (distal

enhancers), maar ER α S305-P prefereert juist promotor regionen, 5' en 3' onvertaalde regionen (UTRs) op het DNA, die zich precies aan het begin of eind van genen bevinden. Dit is het eerste verslag dat aantoonde dat een enkele post-translationale modificatie van ER α grote impact kan hebben op het chromatinebindingslandschap van de receptor. Na deze nieuwe ontdekking is de vraag onvermijdelijk wat andere post-translationale modificaties van ER α voor effect hebben, b.v. fosforylering op andere plekken van de receptor of acetylering. En is dit effect vergelijkbaar met wat wij vinden bij ER α S305-P?

Het transcriptoom is in Hoofdstuk 4 bekeken door PKA-activatie in borstkankercellen. MCF7 is een veelgebruikte borstkankercellijn, die we gestimuleerd hebben met een chemische stof (forskolin) om PKA te activeren. Om het aantal vals-positieve hits te reduceren hebben we daarnaast een benadering toegepast op een andere borstkankercellijn (MDA-MB134), waarbij het regulerende subeiwit (PKA-R1 α), dat de activiteit van PKA remt, verlaagd wordt. Hierdoor kunnen echter meer vals-negatieve hits ontstaan, b.v. doordat het PKA signaaltransductienetwerk reeds verhoogde activiteit vertoont vóór het experiment gestart wordt. Bovendien laat deze benadering juist stabiele, lange-termijn effecten zien van PKA-activatie, en niet zozeer de vroege, tijdelijke effecten. Deze experimentele opzet leverde een set van 100 genen op, die als classifier kan worden toegepast op ER α positieve, tamoxifenbehandelde borstkanker patiënten. Integratie van deze 100 genen met het chromatinebindingslandschap van ER α S305-P om de directe targets voor deze gemodificeerde receptor eruit te extraheren, resulteerde in een lijst van 26 genen. Deze 26 targets vertonen een significante correlatie met slecht ziekteverloop, wat impliceert dat de fosforylering van ER α een essentiële rol speelt in hoe de patiënt reageert op tamoxifen, en dat deze modificatie niet enkel een toevallig neveneffect is van PKA-activatie.

Toen we de 100-genen classifier meer in detail bekeken, ontdekten we dat MYC-gerelateerde genen verrijkt waren in deze set. MYC is een bekend oncogen, wat cel- en tumorgroei bevordert. Sommige van deze genen waren geïdentificeerd als directe ER α S305-P targets, omdat de gefosforyleerde receptor op het chromatine in de buurt van deze genen bindt. Bovendien was het oncogen MYC zelf ook verhoogd in expressie, zij het net beneden de arbitraire drempelwaarde. Hiermee presenteert Hoofdstuk 4 een mogelijke verklaring hoe ER α fosforylering kan leiden tot resistentie tegen tamoxifen bij borstkanker, wat verder gaat dan enkel een correlatie tussen ER α S305-P en resistentie. Dit past in wat reeds beschreven is in de literatuur: MYC-signalering is gecorreleerd met tamoxifenresistentie bij borstkanker. Tevens wordt MYC-genexpressie geactiveerd door ER α en speelt zo een sleutelrol in de groei van borstkankercellen. Hier tonen wij met chromatinebindings-, genexpressie- en celgroei-experimenten een directe link tussen door PKA gefosforyleerde ER α en MYC. Samenvattend spannen onze bevindingen over het hele traject van oestrogenreceptormodificatie tot en met tamoxifenresistentie bij borstkankerpatiënten.

Onze data verklaren niet alleen het moleculaire mechanisme van tamoxifenresistentie door PKA-geïnduceerde ER α S305-fosforylering, maar laten ook zien dat PKA ook effect heeft op genexpressie in afwezigheid van tamoxifen. Wel lijken sommige genen met een chromatinebindingsplek voor ER α S305-P een extra effect te vertonen met tamoxifen, bovenop wat geactiveerd PKA veroorzaakt bij afwezigheid van hormoon, maar het moleculaire mechanisme dat dit veroorzaakt moet nog opgehelderd worden. Het effect van PKA-activatie in afwezigheid van tamoxifen suggereert dat de genen in de classifier al differentieel gereguleerd zouden kunnen zijn in borsttumoren vóór behandeling met tamoxifen. Het feit dat de classifier werkt in twee onafhankelijke patientendatasets steunt deze hypothese, aangezien de genexpressiedata zijn gegenereerd op primair tumormateriaal wat niet is blootgesteld aan tamoxifen. Deze genclassifier zou dus van toegevoegde waarde kunnen blijken bij het voorspellen van tamoxifenrespons bij patiënten, voordat de behandeling gestart wordt.



Figuur 1: Schematische samenvatting van Hoofdstuk 1,3 en 4 van dit proefschrift. Oestrogenreceptor alpha (ERα) bindt tamoxifen en dimeriseert. De ERαS305 fosforyleringsstatus (H1) bepaalt de structurele conformatie van de receptor, wat de binding van coregulatoreiwitten beïnvloedt (H3). Niet-gefosforyleerd ERα kan nog steeds aan het DNA binden, zoals een normale, oestradiolgebonden receptor, maar induceert geen transcriptie en zo wordt tumorcelgroei geblokkeerd. ERαS305-P bindt sterker aan coregatoren in aanwezigheid van tamoxifen dan een niet gefosforyleerde receptor, wat resulteert in verhoogde expressie van specifieke genen (H4). Deze genen zijn onder andere MYC and MYC-gerelateerde genen, die celgroei stimuleren en zo de tumor resistent maken tegen tamoxifen.

Een qPCR test kan worden ontwikkeld om de expressie van geselecteerde genen te meten, gecombineerd met chromatinefragmenten voor specifieke targets van ERαS305-P. Deze test zou dan kunnen worden toegepast als predictietool voor tamoxifenrespons, in combinatie met het eerder beschreven ERαS305-phospho antilichaam. De immunohistochemische kleuring met dit antilichaam, hoewel succesvol in een klinische setting, correleert al met slechter ziekteverloop als slechts één celkern positief kleurt in een tumorplakje onder de microscoop. Een enkele celkern kan makkelijk over het hoofd worden gezien, maar een goede genclassifier kan wellicht meer detecteren als de kleuring niet sterk genoeg is, alsmede vals-negatieven eruit filteren. Een goede methode om ERαS305-P positieve tumorcellen te detecteren zou onnodige tamoxifenbehandeling van patiënten die hier geen baat bij zullen hebben kunnen voorkomen. Bovendien zou een genclassifier, in tegenstelling tot de kleuring, geen last hebben van defosforylering van de receptor, wat kan gebeuren bij weefselpreparatie voor immunohistochemie. De optimale genexpressieclassifier zou verlaagd PKA-R1α bevatten, wat al gecorreleerd is met PKA-activatie, ERαS305-P tamoxifenresistentie bij borstkankerpatiënten, evenals MYC en de MYC-gerelateerde 26-genen set uit Hoofdstuk 4. Door verschillende benaderingen te combineren kunnen betere voorspellingen gedaan worden over tamoxifenresistentie bij borstkankerpatiënten, veroorzaakt door ERαS305 fosforylering. Dit is een belangrijke stap naar rationele, persoonsgebonden behandeling van patiënten met het juiste, effectieve medicijn.

Er worden momenteel stappen gezet om een prospectieve, klinische studie te starten naar tamoxifenresistentie door PKA-geïnduceerde ERαS305-fosforylering. Patiënten zullen in twee groepen verdeeld worden op basis van de immunohistochemische kleuring van tumormateriaal met het antilichaam dat ERαS305-P herkent. Zoals eerder aangegeven zou de bepaling van deze vorm van resistentie verbeterd kunnen worden door de kleuring te combineren met een selectief genexpressieprofiel. Aangezien het in kaart brengen van het transcriptoom middels microarrays een routinebepaling is bij borstkanker, zou een genclassifier gemakkelijk geïntegreerd kunnen worden in een dergelijke klinische studie. Als een tumor negatief kleurt voor ERαS305-P, krijgt de patient tamoxifen voorgeschreven als adjuvante behandeling na het verwijderen van de tumor, omdat ze er waarschijnlijk baat bij gaat hebben. Patiënten die positief zijn voor deze fosforylering zullen niet behandeld worden met tamoxifen, maar krijgen daarvoor

in de plaats aromataseremmers, die mogelijk wel werken. De ideale opzet van deze studie zou zijn om de tweede groep een placebo te geven, maar het is onethisch om deze patiënten enige behandeling te weigeren. In een controlegroep zullen patiënten gerandomiseerd worden, waarbij ze tamoxifen of aromataseremmers ontvangen ongeacht hun ER α S305-P status. We verwachten met deze prospectieve studie aan te tonen dat (een deel van de gevallen van) tamoxifenresistentie te voorspellen is aan de hand van ER α S305-P positiviteit in borsttumoren.

Samenvattend heeft fosforylering van ER α op het Serine 305 aminozuur impact op oestrogeenreceptor-eiwitvouwing en coregulatorbinding. Eén enkele post-translationele modificatie, geïnduceerd door PKA, veroorzaakt een relocalisatie van deze receptor op het chromatine, wat het transcriptoom verandert en daarmee uiteindelijk ook de respons op tamoxifenbehandeling bij een patiënt. Een belangrijke vraag die hierop volgt is: zijn er alternatieven voor de behandeling van patiënten die gedefinieerd worden als non-responders op tamoxifen? Eerdere publicaties suggereren dat selectieve oestrogeenreceptor downregulators (SERD), zoals fulvestrant, effectief de oestrogeenreceptoractivatie in kankercellen zouden kunnen remmen, die PKA-geïnduceerde resistentie vertonen tegen tamoxifen. Het effect van PKA activatie, wat leidt tot ER α S305 fosforylering, op het transcriptoom en celgroei lijkt niet geheel tamoxifenspecifiek te zijn, echter voor een deel van de directe gentargets lijkt tamoxifen een additief effect te hebben. Het zou interessant kunnen zijn om te testen of een SERD, zoals fulvestrant, door ER α af te breken tevens het ER-geïnduceerde MYC netwerk kan blokkeren met als gevolg ook de celgroei kan remmen. Een andere hypothese die niet over het hoofd gezien mag worden is dat een patiënt die resistent is tegen één behandeling gevoeliger kan worden voor een andere, welke normaal gesproken minder effectief zou zijn bij dit type borstkanker. Kanker, ongeacht welke vorm, zou resistent kunnen worden tegen een bepaalde therapie door het ontstaan van een zijspoor langs het moleculaire netwerk waarop de therapie gericht is. Zo kunnen de tumorcellen hun groei afhankelijk maken van andere netwerken en daarmee cel- en tumorafsterving vermijden. Op deze andere netwerken kan echter weer mogelijk worden ingegrepen worden door andere medicijnen, waardoor de tumor ineens reageert op een behandeling die normaal gesproken niet (goed) werkt. Prostaatkanker is een goed voorbeeld: chemotherapie in de vorm van taxanen is normaal gesproken niet effectief in prostaatkanker, maar een subgroup van castratieresistente patiënten wordt juist meer gevoelig voor dit type therapie. Aan de basis van deze nieuwe gevoeligheid ligt een verandering van regulatie in celcyclusnetwerken. Bij borstkanker wordt voorspeld dat triple negatieve type borstkanker veel beter zullen reageren op chemotherapie dan lumbinale (ER-positieve) borstkanker. Het zou dan ook interessant kunnen zijn om te testen of ER-positieve tumoren, die resistent zijn tegen hormoontherapie, gevoeliger geworden zijn voor chemotherapie, in vergelijking met de niet-resistente tumoren.

Een uitdaging voor de toekomst is om het hele chromatinebindingslandschap en transcriptoom voor ER α in kaart te brengen voor andere post-translationele modificaties op de receptor en deze te correleren met het wel of niet aanslaan van antioestrogenen en aromataseremmers bij patiënten. Het is belangrijk om deze data te integreren, opdat nieuwe tools ontwikkeld kunnen worden voor het voorspellen van response van iedere, individuele patiënt op verschillende medicijnen en op die manier werkelijk de behandeling tegen borstkanker te kunnen personaliseren. Als we bij diagnose direct kunnen bepalen bij welke therapie een patiënt het meeste baat zal hebben, kunnen we onnodige behandeling met medicijnen die niet werken voorkomen en daarmee ook eventuele akelige bijwerkingen. Tot nu toe wordt de bepaling veelal op basis van trial-and-error bepaald. Door vooraf de juiste behandeling te bepalen, zal kanker minder kans krijgen om te ontwikkelen tot een agressief stadium. Patiëntgerichte behandeling van kanker zal de kans op ziektevrije overleving en de kwaliteit van leven van de kankerpatiënt verbeteren en dit proefschrift beschrijft hoe dit doel mogelijk bereikt kan worden.

List of publications

A Role for Estrogen Receptor Phosphorylation in the Resistance to Tamoxifen

Renée de Leeuw, Jacques Neefjes, Rob Michalides

International Journal of Breast Cancer 2011, Article ID 232435

The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen

Renée de Leeuw*, Wilbert Zwart*, Mariska Rondaij, Jacques Neefjes, Michael A. Mancini and Rob Michalides

Journal of Cell Science 2010, Vol.123, pp1253-1261

A high-throughput coregulator peptide array detects estrogen receptor alpha Serine-305 phosphorylation that is associated with response to tamoxifen treatment

Renée de Leeuw*, René Houtman*, Mariska Rondaij*, Diana Melchers, Desiree Verwoerd, Rob Ruijtenbeek, John Martens, Jacques Neefjes, Rob Michalides

Molecular Cancer Therapeutics (in revision)

PKA Phosphorylation redirects oestrogen receptor to promoters of a unique gene set to induce tamoxifen resistance

Renée de Leeuw, Cristiane Bentin Toaldo, Sander Canisius, Jacques Neefjes, Rob Michalides, Wilbert Zwart

Submitted

Curriculum vitae

Renée de Leeuw werd 6 mei 1983 geboren te Breda. Zij genoot haar Gymnasium (VWO) opleiding aan het Stedelijk Gymnasium Breda in 2001 en begon vervolgens haar studie Moleculaire Wetenschappen in Wageningen. In 2004 behaalde zij haar BSc Molecular Sciences en vervolgde haar opleiding in Wageningen met de Master Biomedical Research. Zij liep stage op de afdeling Toxicologie bij Dr. Ivonne Rietjens en Dr. Tinka Murk, waar zij de biobeschikbaarheid van xeno-oestrogenen voor de foetus onderzocht. Haar tweede stage liep zij bij Dr. Jan Hoeijmakers met Dr. Ambra-Giglia Mari en Drs. Wim Vermeulen als begeleiders aan het Erasmus MC te Rotterdam. Daar keek zij naar XPB, een eiwit in het TFIIH transcriptiefactor-complex en van belang voor nucleotide excisie reparatie (NER) van DNA. Een derde stage werd gewijd aan Nurr1, een orphan nucleaire receptor, waarvoor geen ligand bindende pocket of cofactor bindingsplek bekend is. Dit onderzoek voerde zij uit bij Organon Pharmaceuticals onder begeleiding van Drs. Arie Visser. Daarmee voltooide zij tevens haar MSc Biomedical Research in 2006 en verkreeg haar ingenieurstitel (ir.).

In 2006 begon Renée haar promotieonderzoek in de groep van Dr. Rob Michalides op de afdeling Tumorbioologie aan het Nederlands Kanker Instituut te Amsterdam en werd aan het einde begeleid door Prof. Dr. Jacques Neefjes en Dr. Wilbert Zwart. Hier voerde zij haar translationele onderzoek uit, dat gericht was op moleculair en cellulair begrip van tamoxifen resistentie, met name door fosforylering van het serine 305 aminozuur van de oestrogeenreceptor, en de vertaling van ontdekkingen naar de kliniek. Betrokkenheid bij de kliniek blijkt tevens uit vrijwilligerswerk in het Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis.

Na de verdediging van haar proefschrift gaat Renée werken in het lab van Dr. Karen Knudsen aan de Thomas Jefferson University, Kimmel Cancer Center in Philadelphia (VS). Daar verruult zij de oestrogeen receptor voor de mannelijke equivalent, de androgeenreceptor, en gaat onderzoek doen naar verbetering van therapie voor castratie resistente prostaatkanker.

