



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Holding the balance; the equilibrium between ER α -activation, epigenetic alterations and chromatin integrity

Flach, K.D.

Citation

Flach, K. D. (2018, September 25). *Holding the balance; the equilibrium between ER α -activation, epigenetic alterations and chromatin integrity*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66110>

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/1887/66110>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66110> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Flach, K.D.

Title: Holding the balance; the equilibrium between ER α -activation, epigenetic alterations and chromatin integrity

Issue Date: 2018-09-25

Addendum

Nederlandse samenvatting

English summary

Nederlands Curriculum Vitae

English Curriculum Vitae

List of publications

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

Waar gaat dit proefschrift over?

In dit proefschrift gaan we in op de effecten die differentiële DNA-binding van estrogen receptor α (ER α) kan hebben op het gedrag van borstkanker en welke factoren daartoe kunnen bijdragen. ER α is een transcriptiefactor die tumorcelproliferatie kan veroorzaken en ongeveer 70% van alle borsttumoren wordt verondersteld afhankelijk te zijn van de activiteit van deze door hormonen geactiveerde transcriptiefactor. Na activatie van ER α wordt een groot aantal cofactoren gerekruteerd, wat leidt tot de vorming van een transcriptiecomplex. Hoewel er meerdere manieren zijn om de werking van ER α te ontregelen en daardoor tumorgroei te remmen, komt toch bij een aanzienlijk deel van de patiënten de tumor terug. Kruisresistentie tussen verschillende endocriene behandelingen kan optreden, maar een deel van de patiënten waarbij de tumor terugkeert na één type therapie kan nog steeds baat hebben bij een andere behandelingsmethode, wat het bestaan van meerdere resistentiemechanismen illustreert welke behandeling specifiek kunnen zijn. Een beter begrip omtrent de werking van ER α en zijn resistentiemechanismen, kan de weg wijzen naar de ontdekking van nieuwe biomarkers en potentieel nieuwe behandelmethodes, die de overleving van de patiënt verder vergroten.

Voorspelling van resistentie

In **Hoofdstuk 2** hebben we aangetoond dat tamoxifen-resistentie door PKA-geïnduceerde fosforylering van ER α op Serine-residu 305 (ER α S305-P), ER α herpositioneert op andere plaatsen van het genoom, resulterend in differentiële genexpressie. Dit veranderde genexpressieprofiel hebben we gebruikt als gen-signatuur en waren instaat hiermee de “survival-outcome” van tamoxifen behandelde patiënten te voorspellen. Naast dit genexpressieprofiel beschrijven we ook de ontdekking van twee enkelvoudige gen-signaturen; FEN1 en SRC3-pS543. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 5**, vonden we dat ER α -coregulator FEN1 correleerde met de survival-outcome van patiënten met ER α -positieve borstkanker, maar niet bij ER α -negatieve patiënten. Interessant genoeg vonden we tevens dat FEN1- eiwithoeveelheden voorspellend waren voor de uitkomst bij ER α -positieve patiënten die adjuvant tamoxifen kregen. Daarnaast beschrijft **Hoofdstuk 6** onze bevindingen over een SRC3-pS543 fosfo-specifiek antilichaam dat in staat was om patiënten met een actieve ER α -pathway te identificeren, wat indicatief is voor een gunstig resultaat in de afwezigheid van adjuvante therapie en daarbij een gebrek aan ta-

Addendum

moxifen-werkzaamheid. Alles tezamen gaan we in op onze bevindingen over drie verschillende biomarkers met het potentieel om de behandelingsrespons van een patiënt op individuele basis te voorspellen. Deze biomarkers kunnen helpen bij het proces van besluitvorming over endocriene behandelingstherapieën wanneer de eerstelijnsbehandeling tamoxifen waarschijnlijk niet zal leiden tot een voordeel voor de patiënt en daarom direct met een alternatieve behandeling gestart kan worden.

Differentiële DNA-binding van ER α

Zoals hierboven kort beschreven, kunnen post-translationele modificaties van ER α , zoals fosforylaties, diens activiteit veranderen en ER α naar andere plaatsen op het DNA sturen, waardoor het DNA-bindingsrepertoire (ook wel bekend als cistrome) wordt veranderd. Dit differentiële cistrome kan een grote invloed hebben op de genen die worden afgeschreven en het resulterende fenotype van een cel. Naast de eerder genoemde ER α S305-P, leveren we in **Hoofdstuk 3** experimenteel bewijs voor een tot nu toe onbekende ER α -fosforylatie (T594P) en laten we zien dat door directe interactie van 14-3-3-eiwitten met ER α , de DNA-bindingscapaciteit sterk verminderd wordt. Door deze fosforyleringsplaats te beschermen met fusicoccin (FC) waren we in staat om deze T594P te stabiliseren en te induceren, wat uiteindelijk resulteerde in verminderde gentranscriptie en geremde celgroei. Naast ER α zelf, kan de fosforylatie van essentiële ER α -cofactoren ook het cistromische repertoire beïnvloeden, zoals beschreven in **Hoofdstuk 6**. Hierin laten we zien dat S543-fosforylatie van SRC3 resulteerde in een verhoogde binding op promotorregio's, terwijl normaal gesproken SRC3 voornamelijk samen met ER α nabij distale enhancers en intronen bindt. Dit veranderde cistromische profiel, samen met de hierboven genoemde bevindingen dat SRC3-pS543-expressie geassocieerd was met een slechte respons bij een tamoxifen behandeling, maakt het zeer waarschijnlijk dat pS543 ook de genexpressie van borstkanker kan veranderen en daardoor uiteindelijk haar fenotype.

Nieuwe drug targets

Minimalisatie van het aantal genen in een voorspellend genexpressieprofiel kan niet alleen een profiel makkelijker implementeerbaar maken in de kliniek, maar kan ook worden gebruikt om nieuwe drug targets te identificeren door de causale genen uit een voorspellend profiel te destilleren. In **Hoofdstuk 5** demonstreren we hier een voorbeeld van met de ontdekking van FEN1 als cruciale ER α -coregulator door minimalisatie van een 111-genenprofiel.

We toonden aan dat het wijzigen van FEN1- eiwithoeveelheden door knock-down of over expressie resulteert in differentiële ER α -activiteit, wat impliceert dat FEN1 een veelbelovend doelwit kan zijn bij ER α -positieve borstkanker. We testten een groot aantal kleine chemische verbindingen voor hun effect op FEN1-remming, wat uiteindelijk leidde tot de ontdekking van een FEN1-specifieke en krachtige remmer. We onderzochten het potentieel hiervan als een nieuwe therapeutische optie door de werkzaamheid ervan in borstkankercellijnen te onderzoeken, waarbij een duidelijke gevoeligheid van ER α -positieve borstkankercellijnen voor deze remmer werd aangetoond in vergelijking met ER α -negatieve cellijnen. De nog grotere gevoeligheid van tamoxifen-resistente varianten van de ER α -positieve cellijnen, suggereert dat FEN1-remming nuttig kan zijn bij tamoxifen-resistente borstkankerpatiënten als een alternatieve therapie. Hoewel veelbelovend, op dit moment is het nog te vroeg om definitief te weten of FEN1-remming op zichzelf een realistische therapeutische optie zou zijn.

Bovendien kan de stabilisatie van ER α -T594P door FC die we in **Hoofdstuk 3** beschrijven, ook een nieuwe therapeutische optie opleveren. We hebben aangetoond dat FC-toediening leidt tot verminderde transactivatie van ER α en vervolgens resulteerde in remming van cel proliferatie. Op dit moment kan de relatief lage bindingsaffiniteit van FC echter een belemmering vormen voor verdere preklinische ontwikkeling. Verder onderzoek naar het identificeren van fusicocanen met een hogere bindingsaffiniteit zal nodig zijn om eventuele therapeutische opties verder te onderzoeken.

Nieuwe mechanistische inzichten

Zoals besproken in **Hoofdstuk 1**, wordt de activiteit van ER α niet alleen beïnvloed door zijn coregulatoren, maar ook door andere nucleaire receptoren. In **Hoofdstuk 4** laten we een voorbeeld hiervan zien met liver receptor homolog-1 (LRH-1). Knockdown van LRH-1-eiwithoeveelheden leidde tot een subset van 222 differentieel tot expressie gebrachte genen, welke bekend zijn als ER α geïnduceerde genen. We laten zien dat er een grote overlapping is tussen de chromatine-interacties van LRH-1 en ER α . In deze gedeelde regio's stimuleerden beide receptoren elkaars binding, wat leidde tot een verhoogde rekrutering van ER α -coregulatoren en veranderde genexpressie. Tot op heden is het exacte mechanisme achter deze synergetische stimulatie nog onbekend. Een ander aanvullend nieuw inzicht in ER α -biologie wordt beschreven in **Hoofdstuk 5**, waar we bewijs leveren dat FEN1 een ER α -coregulator is die in staat is om ER α -activiteit op meerdere manieren te reguleren. 1) Het in kaart

Addendum

brengen van het methylome (de delen van het DNA die gemethyleerde base bevatten) na ER α -stimulatie met en zonder FEN1-remmer onthulde dat FEN1 een sleutelrol speelt bij actieve DNA-demethylatie, waardoor een deel van de lokale epigenetische repressie wordt verlicht. 2) Remming van FEN1 resulteerde in verminderde rekrutering van chromatine her-modelleringsfactor BRG1 op plaatsen van ER α chromatine-interacties, waardoor de activerende aard van ER α -geïnduceerde chromatine her-modellering afnam. 3) Remming van het proteasoom verhinderde de door FEN1-remming geïnduceerde reductie van ER α chromatine-interacties. Dit suggereert dat FEN1 ER α chromatine-interacties kan stabiliseren door de proteasoom-gemedieerde afbraak van ER α te voorkomen.