



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Using insertional mutagenesis to identify breast cancer drivers and therapy resistance genes in mice = Insertie mutagenese voor het identificeren van genen betrokken bij de ontwikkeling van borsttumoren en therapie resistentie in muizen

Kas, S.M.

Citation

Kas, S. M. (2018, November 14). *Using insertional mutagenesis to identify breast cancer drivers and therapy resistance genes in mice = Insertie mutagenese voor het identificeren van genen betrokken bij de ontwikkeling van borsttumoren en therapie resistentie in muizen*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66879>

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/1887/66879>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66879> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kas, S. M.

Title: Using insertional mutagenesis to identify breast cancer drivers and therapy resistance genes in mice

Issue Date: 2018-11-14

Nederlandse samenvatting

Met bijna 1,7 miljoen nieuwe gevallen per jaar is borstkanker de meest voorkomende vorm van kanker onder vrouwen wereldwijd. De laatste decennia is duidelijk geworden dat borstkanker een complexe en heterogene ziekte is, die kan worden onderverdeeld in meerdere subtypen en van elkaar verschillen in morfologie, genetische veranderingen, moleculaire kenmerken, respons op anti-kanker behandelingen en klinische prognose. Ondanks de verbeterde overlevingspercentages van borstkankerpatiënten door de implementatie van screeningmethoden en de voortuitgang in klinische behandelingsmogelijkheden, blijft het moeilijk om patiënten met tumoren die zich in een vergevorderd stadium bevinden met succes te behandelen. Om de klinische prognose van patiënten met invasieve borstkanker te verbeteren is het van cruciaal belang om de genen en de biologische signaleringsroutes te identificeren die de groei van tumoren bevorderen om ons begrip van de ziekte te vergroten en om nieuwe therapeutische opties te vinden. In dit proefschrift hebben we verschillende genetische technieken toegepast in muizen om de rol van potentiële kankergenen en signaleringsroutes te bestuderen in de ontwikkeling van het invasief lobulair mammacarcinoom (ILC), het op één na meest voorkomende subtype van borstkanker. ILCs worden gekenmerkt door het verlies van het E-cadherine eiwit en vertonen over het algemeen gunstige klinische kenmerken, waaronder een laaggradige histologie, trage celdeling en positieve hormoonreceptorstatus. Echter vertonen deze tumoren ook een invasieve groei in het omliggende gezonde weefsel, waardoor ze moeilijk te detecteren zijn met de gebruikelijke screeningsmethoden. Hierdoor bestaat de kans dat deze patiënten pas later worden gediagnosticeerd met tumoren in een gevorderd stadium.

Om de complexiteit van borstkanker te illustreren hebben we de huidige relevante literatuur beschreven in **hoofdstuk 1**, met de nadruk op de histopathologische, genetische en moleculaire kenmerken van ILCs. Verder beschrijven we de voor- en nadelen van genetisch gemodificeerde muismodellen om de bijdrage van potentiële kankergenen in de ontwikkeling, groei en uitzaaiing van tumoren te bestuderen. We verwachten dat de recente vooruitgang in technieken omtrent genetische manipulatie de validatie van potentiële kankergenen in muismodellen zal stimuleren. Verder zullen deze verbeterde muismodellen ons begrip van diverse aspecten van de tumorbiologie verbeteren, inclusief de interacties tussen tumorcellen en hun omgeving en hun rol in respons op, en resistentie tegen nieuwe anti-kanker geneesmiddelen.

Grootschalige studies identificeren op grote snelheid de veranderingen in het genetische materiaal van humane tumoren. Het blijft echter een uitdaging om uit te zoeken welke specifieke genetische veranderingen nu precies een rol spelen in de ontwikkeling van tumoren en welke niet. Potentiële kankergenen moeten gevalideerd worden in tumormodellen die veel gelijkenis vertonen met humane tumoren. In **hoofdstuk 2** beschrijven we een nieuwe strategie bij muizen om op een snelle manier te testen wat de bijdrage is van een potentiële kankergen in de ontwikkeling van ILCs. In deze strategie hebben we virussen geïnjecteerd

om specifieke genen te activeren of te inactiveren die betrokken zijn bij de PI3K-AKT-signaleringsroute, een route die frequent actief is in humane ILCs. Met deze aanpak konden we de tumor-initiërende cellen infecteren en aantonen dat de gecombineerde inactivatie van het E-cadherine eiwit en activering van een oncogene AKT-variant resulteerde in de ontwikkeling van ILCs die zeer veel gelijkenis vertoonden met de humane tumoren. Verder hebben we ook de ontwikkeling van dit type borsttumoren in muizen geïnitieerd door de somatische inactivatie van het tumorsuppressorgen *Pten* in E-cadherine-negatieve borstepitheelcellen met behulp van CRISPR/Cas9-technologie. Dit platform is daarom uiterst geschikt om op een snelle manier potentiële tumorsuppressorgen te testen die mogelijk betrokken zijn bij de ontwikkeling van ILCs.

Ondanks het feit dat de meeste humane ILCs worden gekenmerkt door het verlies van het E-cadherine eiwit, zijn muizen met borstspecifieke inactivatie van het E-cadherine gen niet gevoelig om borsttumoren te ontwikkelen. Dit suggereert dat extra genetische veranderingen in andere genen nodig zijn om dit type borsttumoren te ontwikkelen. Om deze genen te identificeren hebben we gebruik gemaakt van een insertie mutagenese screen met behulp van het 'Sleeping Beauty' (SB) transposon systeem in muizen waarin het E-cadherine gen specifiek uitgeschakeld is in borstepitheelcellen (**hoofdstuk 3**). Deze transposons zijn kleine genetische sequenties die doormiddel van een knip-en-plak mechanisme op andere plaatsen in het genetische materiaal (het genoom) terecht kunnen komen. Afhankelijk van de oriëntatie en de locatie in het genoom waar ze terechtkomen kunnen zij genen aanzetten of juist uitschakelen. De muizen waarin dit systeem actief was ontwikkelden meerdere onafhankelijke borsttumoren waarvan het merendeel sterke gelijkenissen vertoonde met de humane tumoren op basis van morfologie en genexpressie. Het analyseren van deze transposon integraties leverde een lijst op met bekende en nieuwe potentiële kankergenen die een rol spelen in de ontwikkeling van ILCs. Hiermee werd duidelijk dat insertie mutagenese een geschikte techniek in muizen is om nieuwe potentiële kankergenen te ontdekken. Veel voorkomende transposon integraties werden geïdentificeerd in vier verschillende genen, waarvan drie genen ook afwijkende expressie vertoonden in humane ILCs. Verder spelen deze genen allemaal een rol bij de regulatie van het actine cytoskelet, wat suggereert dat een verstoorde regulatie van dit proces betrokken is bij de ontwikkeling van dit type borsttumoren.

In insertie mutagenese screens wordt de analyse om transposon integraties te identificeren gedaan door het gericht DNA-sequencen van de transposon integraties gevolgd door computationele strategieën om potentiële kankergenen aan te wijzen. Deze strategieën bieden echter geen direct bewijs dat de transposon integraties daadwerkelijk de voorspelde genen beïnvloeden. In **hoofdstuk 4** hebben we IM-Fusion ontwikkeld, een methode dat gebruik maakt van RNA-sequencing informatie om de locaties van gen-transposon fusies te identificeren. Met behulp van deze methode waren we in staat om transposon integraties en de potentiële kankergenen nauwkeurig te identificeren in twee verschillende transposon screens van respectievelijk borsttumoren en acute lymfatische leukemieën. Een voordeel van IM-Fusion is dat de genexpressie kwantificering



kan worden gecombineerd met de locatie van de transposon integraties om het effect van een transposon op een specifiek gen te bepalen, deze informatie kan worden gebruikt om prioriteit te geven aan het valideren van specifieke potentiële kankergenen. Deze methode leverde ook nieuwe inzichten op over het onderliggend mechanisme voor het ontwikkelen van ILCs door de expressie van PPP1R12A, PPP1R12B en TRP53BP2 eiwitten (**hoofdstuk 3**), aangezien een sterke verrijking van transposon integraties in de bijbehorende genen de expressie van verkorte transcripten suggereerde. Analyse van de genexpressie voor en na de integratie locaties bevestigde de verhoogde expressie van verkorte *Ppp1r12a*, *Ppp1r12b* en *Trp53bp2* transcripten. Dit resulteerde in de expressie van eiwitten waarin verschillende regulerende domeinen verloren waren, waardoor de activiteit van deze eiwitten in de cel veranderd waren.

In **hoofdstuk 5** presenteren we een ander voorbeeld van de kracht van insertie mutagenese screens om potentiële kankergenen te identificeren en gerelateerde biologische functies van specifieke eiwitdomeinen te ontdekken. In meer dan de helft van de door SB-geïnitieerde borsttumoren in de muis identificeerden we transposon integraties in het *Fgfr2* gen (**hoofdstuk 3**). De meerderheid van deze transposons was gegroepeerd in het laatste intron, wat resulterende in de expressie van C-terminaal verkorte *Fgfr2* transcripten. Met behulp van genetisch gemanipuleerde muizen laten we zien dat expressie van verkorte FGFR2 eiwitvarianten specifiek in borstepitheelcellen op korte termijn resulteerde in de ontwikkeling van borsttumoren, terwijl dit niet het geval was bij de expressie van het volledige FGFR2 eiwit. Verder laten we zien dat de C-terminus van het FGFR2 eiwit meerdere domeinen bevat die essentieel zijn voor het onderdrukken van tumorontwikkeling, wat suggereert dat verschillende factoren de activiteit van FGFR-signalering reguleren via het einde van het eiwit.

In **hoofdstuk 6** hebben we insertie mutagenese in muizen gebruikt om genen te identificeren die resistentie veroorzaken tegen een FGFR remmer. Dit hebben we gedaan door middel van het transplanteren van SB-geïnitieerde borsttumoren met actieve FGFR-signalering in muizen, die werden behandeld met de klinisch relevante FGFR-remmer AZD4547. Deze tumoren waren aanvankelijk gevoelig voor de behandeling, maar werden uiteindelijk resistent tegen de remmer. Door het analyseren van het transcriptoom en de transposon integraties in AZD4547-resistente tumoren was het mogelijk om bekende en nieuwe resistentie mechanismen te ontdekken, die allemaal leiden tot de reactivatie van de MAPK-ERK-signaleringsroute. Twee van deze mechanismen werden ontdekt door het identificeren van transposon integraties die alleen aanwezig waren in AZD4547-resistente tumoren, wat aantoont dat insertie mutagenese in muizen een effectieve methode is om resistentie mechanismen tegen anti-kanker behandelingen te identificeren.

Samengevat beschrijft dit proefschrift de identificatie van potentiële kankergenen in de ontwikkeling van ILCs en genen die resistentie veroorzaken tegen een specifieke FGFR remmer door middel van insertie mutagenese screens in muizen. Met behulp van deze screens konden we ook biologische processen ontdekken

die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van deze borsttumoren. Hiermee tonen we aan dat dit een effectieve genetische techniek is voor het bestuderen van kankerbiologie in muismodellen.

