



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeted therapy for triple-negative breast cancer

McLaughlin, R.P.

Citation

McLaughlin, R. P. (2018, December 13). *Targeted therapy for triple-negative breast cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/68194>

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/1887/68194>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/68194> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: McLaughlin, R.P.

Title: Targeted therapy for triple-negative breast cancer

Issue Date: 2018-12-13

Nederlandse samenvatting

Doelgerichte therapie voor triple negatieve borstkanker

Triple negatieve borstkanker (TNBK) is een agressieve vorm van borstkanker die, anders dan de hormoongevoelige vormen, gekenmerkt wordt door het ontbreken van de volgende hormoonreceptoren: de estrogeen receptor (ER), de progesteron receptor (PR) en de HER2 receptor. Dit heeft tot gevolg dat anti-hormonale therapieën zoals tamoxifen niet werken in TNBK en de huidige therapie nog steeds bestaat uit een combinatie van het chirurgisch verwijderen van de tumor, chemotherapie en/of bestraling. Na de ontdekking van chemotherapie, zijn geen nieuwe behandelingen voor TNBK op de markt gekomen, wat eens te meer duidelijk maakt dat ontwikkeling van nieuwe specifieke geneesmiddelen essentieel is voor de genezing van deze ziekte. Daarom was het voornaamste doel van dit proefschrift het ontdekken van nieuwe TNBK-specifieke afhankelijkheden, met een belangrijke nadruk op nieuwe synergetische combinaties bestaande uit klinisch goedgekeurde middelen in combinatie met nieuwe doelgerichte moleculen.

In **hoofdstuk 2** werden de verschillen in gevoeligheid van TNBK cellen voor MEK- en Akt-remmers onderzocht. Screening van kinase remmers in TNBK cellijnen liet zien dat deze cellijnen in drie afzonderlijke groepen te verdelen zijn op basis van gevoeligheid voor meerdere MEK- en Akt-remmers; Akt-remmer resistente cellijnen (Groep 1), MEK-remmer resistente cellijnen (Groep 2) of MEK- en Akt-remmer resistente cellijnen (Groep 3). Een verhoogd niveau van gefosforyleerd Akt en mutaties in PIK3CA, PIK3R1 en/of PTEN onderscheiden MEK-remmer-resistente/Akt-remmer-gevoelige cellijnen van Akt-remmer-resistente/MEK-remmer-gevoelige cellijnen. Behandeling van dubbelresistente cellijnen met een

combinatie MEK- en Akt-remmers veranderde niets aan de ongevoeligheid van deze cellijnen, noch resulteerde het in synergistische responsen in de andere groepen. Analyse van transcriptomics en proteomics data liet significant hogere niveaus zien van genen betrokken bij regulatie van de celcyclus in MEK/Akt-remmer dubbelresistente cellijnen. Daarnaast waren cellijnen die resistent zijn tegen zowel MEK- als Akt-remmers gevoeliger voor pan-CDK-remmers dinaciclib en flavopiridol. Behandeling met deze remmers verminderde CDK-gemedieerde signaaltransductie en induceerde DNA-beschadiging, hetgeen suggereert dat de MEK/Akt-remmer dubbelresistente subgroep kan profiteren van een alternatieve therapie in de vorm van CDK-remmers.

In **hoofdstuk 3** wordt de resistentie van TNBK cellijnen voor epidermale groeifactor receptor (EGFR) – tyrosine kinaseremmers (TKIs) beschreven. EGFR niveaus zijn hoger in TNBK in vergelijking met ER positieve tumoren en daarnaast geassocieerd met het basale cellijn subtype. Uit onderzoek naar de respons van verscheidene TNBK cellijnen op EGFR-TKIs bleek dat de meerderheid van de TNBK cellijnen resistent was tegen EGFR-remmers, ondanks dat het verminderen van de EGFR expressie zelf de groei van de cellijnen duidelijk remde. Deze verschillen in gevoeligheid waren onafhankelijk van de functionaliteit van EGFR signalering: in alle cellijnen werd deze signalering geactiveerd na behandeling met EGF en geremd na behandeling met de EGFR-TKIs lapatinib, erlotinib en gefitinib. Om nieuwe remmers te identificeren die EGFR-TKI-resistente TNBK cellen gevoelig zouden kunnen maken, werden TNBK cellijnen behandeld met verscheidene kinaseremmers in combinatie met een klinisch relevante dosis van lapatinib. Het combineren van de dubbele cdc7/CDK9-remmer PHA-767491 (PHA) met EGFR-TKIs verminderde de groei en induceerde apoptose in TNBK cellen in

vergelijking met monotherapie, wat PHA een veelbelovende kandidaat remmer maakt. De dubbele behandeling van PHA met EGFR-TKIs verminderde signalering die essentieel is voor cdc7 gereguleerde DNA replicatie en CDK9 gecontroleerde initiatie van transcriptie en leidde gelijktijdig tot een stop in de G2-M fase in de celcyclus. Bovendien waren verhoogde niveaus van cdc7 en RNA polymerase II, het eiwit waar CDK9 direct op aangrijpt, geassocieerd met een grotere kans op het ontwikkelen van uitsaaiingen in TNBK patiënten. Combinatie therapie in TNBK cellen resulteerde in remming van signaalroutes betrokken bij celgroei, transcriptie en overleving, wat suggereert dat gerichte remming van CDK9 in combinatie met EGFR remming een krachtige strategie kan zijn om TNBK te bestrijden.

In **hoofdstuk 4** is de effectiviteit van een verscheidene CDK-remmers met sterke anti-P-TEFb/CDK9 activiteit vastgesteld, om zo de potentie van het aangrijpen van de afwijkende transcriptie regulatie via CDK9 te onderzoeken. TNBK cellijnen waren gevoelig voor remmers van CDK1, CDK2, CDK7 en CDK9, wat benadrukt dat deze cellen erg afhankelijk zijn van regulatie van de celcyclus en transcriptie. Behandeling met deze remmers voorkwam de P-TEFb/CDK9-gemedieerde fosforylering van RNA polymerase II en de expressie van verschillende anti-apoptotische factoren, zoals MCL-1 en BCL-xL. Daarnaast induceerden deze remmers apoptose en DNA schade in de TNBK cellijnen. De depletie van MCL-1 door CDK9-remmers vond plaats via een proteasoom-afhankelijke manier, aangezien de proteasoom remmer MG-132 de MCL-1 depletie voorkwam. Om te achterhalen welke moleculaire routes en transcriptionele programma's het meest worden beïnvloed door deze remmers, werd het transcriptoom na behandeling met deze CDK9-remmers in kaart gebracht. Genen betrokken bij TGF- β , BMP en

Wnt/ β -catenin signaleringsroutes, progressie van de celcyclus, het herstellen van DNA schade, en epitheliaal-naar-mesenchymaal transitie (EMT) waren de meest verminderd tot expressie gekomen genen. De transcripten die het meest aangetast werden waren voornamelijk transcriptiefactoren. Een aantal van deze (SOX9, EN1 en PLAG1) waren cruciaal voor de proliferatie van verschillende TNBK cellijnen en kwamen hoog tot expressie in basale-achtige tumoren. Samenvattend laten deze resultaten dus zien dat CDK-remmers met anti-p-TEFb/CDK9 activiteit erg efficiënt zijn in in vitro modellen van TNBK.

Aangezien resistentie tegen therapieën met één aangrijpingspunt zich bijna altijd ontwikkeld in de kliniek, is in **hoofdstuk 5** het effect van het combineren van de CDK9-remmers beschreven in **hoofdstuk 4** met geneesmiddelen die ofwel geaccepteerd zijn voor klinisch gebruik, ofwel zich momenteel in pre-klinische onderzoeksfases bevinden, getest. Sterke synergie werd gezien bij combinatie van de pre-klinische BET-remmer JQ1 met CDK9-remmers I-73 of LY3-21. Deze synergie leidde tot vermindering van MCL-1 en BCL-2 expressie, en activering van de respons die DNA schade herstelt. Combinatie van I-73 en LY3-21 met EGFR-TKIs lapatinib en gefitinib herstelde de gevoeligheid van TNBK cellen voor EGFR tyrosine kinase inhibitie en induceerde een halt in de G2/M fase van de celcyclus, wat gepaard ging met apoptose. Via het kwantitatief in kaart brengen van de algehele RNA expressie, ofwel 'RNA sequencing', werd achterhaald dat de combinatiebehandeling van I-73 en lapatinib de inhibitie van transcriptie door I-73 versterkte. De signaleringsroutes die hierbij het meest verstoord werden waren TGF- β signalering, progressie van de celcyclus en stamcel pluripotentie. Een aantal transcriptionele regulators die specifiek verlaagd tot expressie kwamen door de combinatie van I-73 en lapatinib waren geassocieerd het vormen van

uitzaaiingen in een cohort van TNBK patiënten. Kortom, het remmen van P-TEFb/CDK9 activiteit kan de resistentie van TNBK cellen tegen EGFR-TKIs en BET-remmers teniet doen.

Concluderend, het werk in dit proefschrift laat zien dat EGFR-resistente TNBK tumoren gevoelig gemaakt kunnen worden met behandeling met CDK-remmers, welke transcriptie remmen via P-TEFb/CDK9 in tumoren die afhankelijk zijn van EGFR-gemedieerde signaaltransductie en/of een nauwkeurig gecontroleerde celcyclus hebben.