



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Into the blue...Using mouse models to uncover genes driving tumorigenesis and therapy resistance in human breast cancer

Ruiter, J.R. de

Citation

Ruiter, J. R. de. (2019, May 22). *Into the blue..Using mouse models to uncover genes driving tumorigenesis and therapy resistance in human breast cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/73551>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/73551>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/73551> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Ruiters, J.R. de

Title: Into the blue...Using mouse models to uncover genes driving tumorigenesis and therapy resistance in human breast cancer

Issue Date: 2019-05-22

A.2 Nederlandse samenvatting

Kanker is een ziekte waarbij normale cellen worden gedereguleerd door verstoring van hun cellulaire processen, wat resulteert in verhoogde proliferatie, overleving en invasie van de omringende weefsels. Kanker wordt over het algemeen veroorzaakt door mutaties in zogenaamde ‘driver-genen’, die cellen een selectief groeivoordeel geven en hun kwaadaardige transformatie aansturen. Om kankerbehandelingen te verbeteren, proberen onderzoekers en artsen precies te identificeren welke mutaties in een bepaalde tumor aanwezig zijn om vervolgens gerichte antikankermedicijnen toe te passen die op deze mutaties aangrijpen. Eén van de grootste problemen van deze zogeheten ‘personalized medicine’ strategie is dat het lastig is om te bepalen welke mutaties de echte ‘drivers’ zijn omdat de meeste tumoren grote aantallen ‘passenger’ mutaties bevatten die niet bijdragen aan de ontwikkeling van de tumor. Daarnaast worden tumoren vaak resistent na langdurige behandelingen, waardoor de klinische effectiviteit van veel gerichte antikankermedicijnen beperkt is.

Om deze tekortkomingen te verhelpen, is het cruciaal om (i) precies te bepalen welke mutaties een rol spelen in de ontwikkeling van bepaalde kankertypes en (ii) potentiële resistentiemechanismen voor bepaalde therapieën te identificeren. Het identificeren van driver-genen in humane studies is echter nog steeds een uitdaging vanwege de grote hoeveelheden potentiële driver-genen die worden geïdentificeerd in deze studies. Daarnaast wordt de identificatie van alle mogelijke resistentiemechanismen bemoeilijkt door lage beschikbaarheid van biopten van tumoren voor en na behandeling. Modelsystemen zoals muizen bieden verschillende complementaire benaderingen voor het bestuderen van tumorontwikkeling omdat ze het mogelijk maken om hernieuwbare modellen te genereren die veel aspecten van verschillende menselijke kankersoorten bevatten. Deze modellen kunnen vervolgens worden gebruikt om potentiële driver-genen te testen en verschillende mechanismen van therapie resistentie te identificeren. Een overzicht van alle verschillende modelsystemen en hun toepassingen wordt gegeven in **Hoofdstuk 1**.

In dit proefschrift hebben we ons voornamelijk gericht op het gebruik van genetisch gemodificeerde muizen om driver-genen en therapieresistentie-mechanismen te identificeren in twee verschillende soorten borstkanker: invasief lobulair carcinoom (ILC) en triple-negatieve borstkanker (TNBC) (**Hoofdstuk 2**). ILC is een histologisch subtype van borstkanker dat verantwoordelijk is voor 10-15% van alle gevallen van borstkanker. ILC wordt gekenmerkt door mutaties in E-cadherine. Hoewel ILCs over het algemeen verhoogde expressie van ER α vertonen, zijn de overlevingskansen voor ILC-patiënten doorgaans slechter dan voor patiënten met andere ER-positieve borsttumoren, wat aangeeft dat biologische verschillen de therapiegevoeligheid beïnvloeden. TNBCs zijn verantwoordelijk voor 10-17% van alle gevallen van borstkanker

en worden gekenmerkt door lage expressie van HER2 en de hormoonreceptoren ER α en PR. TNBCs kunnen daarom niet worden behandeld met anti-hormonale therapieën of geneesmiddelen tegen HER2, waardoor chemotherapie nog steeds de standaardbehandeling vormt. Gecombineerd met de agressieve aard van deze tumoren resulteert dit in een relatief slechte prognose voor patiënten met TNBC.

Een overeenkomst van ILCs en TNBCs is dat ze minder gunstig reageren op bestaande therapieën dan andere soorten borstkanker. Het is daarom belangrijk om te onderzoeken welke driver-genen de ontwikkeling van deze borstkankersoorten stimuleren, waardoor het mogelijk wordt om gerichte geneesmiddelen te ontwikkelen die specifiek aangrijpen op kwetsbaarheden die deze driver-genen met zich meebrengen.

In **Hoofdstuk 3** hebben wij het *Sleeping Beauty* (SB) transposon systeem gebruikt om een insertiemutagenese (IM) screen uit te voeren in een muismodel met borstklier-specifiek verlies van E-cadherine, teneinde mogelijke driver-genen van ILC te identificeren. Gezamenlijk verlies van E-cadherine en activering van het SB transposon systeem leidde in muizen tot ontwikkeling van borsttumoren die leken op menselijke ILCs, wat de relevantie van ons model ondersteunde. Analyse van de transposon-inserties in deze tumoren leidde tot de identificatie van verschillende bekende en nieuwe driver-genen, die mogelijk gebruikt kunnen worden om nieuwe therapieën te ontwikkelen. Een opvallende ontdekking is dat vier van deze driver-genen (*Myh9*, *Ppp1r12a*, *Ppp1r12b* en *Trp53bp2*) vaak voorkwamen maar nooit samen gemuteerd waren, wat aangeeft dat ze waarschijnlijk een rol spelen in hetzelfde biologische proces. Verder onderzoek wees uit dat alle vier de genen betrokken zijn bij de regulatie van het actine cytoskelet in de tumorcellen. Drie van deze genen (*MYH9*, *PPP1R12B* en *TP53BP2*) zijn ook vaak gemuteerd in borsttumoren bij de mens, wat aangeeft dat dit nieuwe oncogene proces mogelijk een aangrijpingspunt vormt voor de ontwikkeling van toekomstige therapieën.

Een van de belangrijkste uitdagingen bij het analyseren van insertiemutagenese screens is dat de transposon-inserties veel potentiële kankergenen kunnen identificeren waarvan waarschijnlijk slechts een klein deel daadwerkelijk betrokken is bij tumorontwikkeling. Bovendien geven de DNA-gebaseerde benaderingen die vaak worden gebruikt om kandidaat-genen te identificeren, weinig inzicht in hoe de expressie van genen wordt beïnvloed door de transposon-inserties, waardoor biologisch inzicht in het effect van inserties wordt beperkt. In **Hoofdstuk 4** hebben wij daarom een nieuwe methode ontwikkeld, genaamd IM-Fusion, die deze problemen omzeilt door transposon-inserties te identificeren via detectie van fusies tussen de transposons en de betrokken genen in RNA-sequencing data. Deze methode verbetert de detectie van inserties door precies vast te stellen welke genen betrokken zijn bij een fusie en daarnaast te testen op het effect van de insertie op genexpressie. Om onze methode te toetsen, hebben we IM-Fusion toegepast op twee bestaande

RNA-sequencing datasets van tumoren waarvoor ook DNA-sequencing datasets beschikbaar waren. Onze vergelijking van IM-Fusion met de DNA-gebaseerde insertie analyses liet zien dat IM-Fusion accurater is bij het detecteren van transposon-inserties en de betrokken genen.

In **Hoofdstuk 5** hebben we vervolgens onderzocht hoe BRCA1-gemuteerde TNBC wordt beïnvloed door de aanwezigheid van verschillende bekende driver-genen (*Myc*, *Met* en *Rb1*). We hebben gekeken of genetisch gemodificeerde muizen met deze driver-genen gebruikt kunnen worden om genen te identificeren die collaboreren met een specifiek driver-gen in de ontwikkeling van BRCA1-gemuteerde TNBC. Ons onderzoek liet zien dat tumoren met MYC-overexpressie een compleet ander mutatieprofiel vertoonden dan andere tumoren, wat aangaf dat de evolutie van deze tumoren sterk werd beïnvloed door de hoge MYC-activiteit. Door gemuteerde regio's in de muizentumoren te vergelijken met de gemuteerde regio's in TNBCs van patiënten, ontdekten we MCL1 als een belangrijke driver die specifiek geamplificeerd is in MYC-gedreven TNBC, wat suggereert dat MCL1 samenwerkt met MYC in de ontwikkeling van BRCA1-gemuteerde TNBC. Deze hypothese wordt verder ondersteund door experimenten in een 'patient-derived tumor xenograft' muismodel voor BRCA1-gemuteerde TNBC, die aantoonde dat MCL1 remming de effectiviteit van de poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) remmer olaparib (een remmer die specifiek aangrijpt op de BRCA1 mutatie in deze tumoren) verhoogt. Dit geeft aan dat de combinatie van PARP-remmers met MCL1-remmers mogelijk een kansrijke therapie is voor patiënten met BRCA1-gemuteerde TNBC die niet goed reageren op behandeling met alleen PARP-remmers.

In de resterende hoofdstukken hebben we ons gericht op het identificeren van mogelijke resistentiemechanismen voor gerichte behandelingen in ILC en TNBC.

Naar aanleiding van onze insertiemutagenese screen in Hoofdstuk 3, onderzochten we in **Hoofdstuk 6** de effectiviteit van FGFR-remming in ILC, aangezien *Fgfr2* vaak werd geactiveerd door transposon-inserties in de tumoren. Om het effect van FGFR-remming in deze tumoren te onderzoeken, transplanteerden we tumorfragmenten van een ILC met geactiveerde FGFR-signalering in meerdere muizen, die vervolgens werden behandeld met de FGFR-remmer AZD4547. Dit liet zien dat tumoren aanvankelijk goed reageerden op de behandeling, maar snel resistent werden tegen de remmer. Om mogelijke resistentiemechanismen te identificeren, hebben we de actieve insertiemutagenese in deze tumoren gebruikt om nieuwe transposon-inserties te identificeren die tijdens de behandeling optraden en mogelijk de waargenomen resistentie kunnen verklaren. Combinatie van deze insertie-analyse met transcriptomische analyse van dezelfde tumoren leidde tot de identificatie van verschillende bekende en onbekende resistentiemechanismen. Een belangrijk punt is dat twee resistentiemechanismen alleen werden geïdentificeerd via de insertie-analyse, wat

aantoont dat insertiemutagenese een effectief hulpmiddel is voor het identificeren van resistentiemechanismen tegen gerichte behandelingen in muizen.

In **Hoofdstuk 7** hebben we onderzocht hoe BRCA2-gemuteerde TNBCs resistentie ontwikkelen tegen PARP-remmers (PARPi), een nieuwe klasse antikankermedicijnen die specifiek aangrijpen op de HR-deficiëntie van BRCA-gemuteerde tumoren. Hiertoe voerden we een tweetal *in vitro* PARPi-resistentie screens uit in BRCA2-deficiënte borsttumorcellen. Daarnaast hebben we ook een *in vivo* analyse uitgevoerd door tumorfragmenten van BRCA2-deficiënte borsttumoren te transplanteren in meerdere muizen en deze muizen te behandelen met PARP-remmers, waarna we vervolgens de mutaties in PARPi-gevoelige en -resistente tumoren vergeleken. Opvallend genoeg, identificeerden beide analyses het verlies van poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) als het belangrijkste PARPi-resistentiemechanisme in BRCA2-deficiënte borsttumoren. Verdere experimenten toonden aan dat PARG-depletie PAR-vorming herstelt en daarnaast de progressie van de DNA-replicatievork herstelt en de rekrutering van DNA-reparatiefactoren bevordert. De klinische relevantie van PARG-verlies als een resistentiemechanisme wordt verder ondersteund door de aanwezigheid van PARG-negatieve cellen in een subset van humane TNBCs en eierstokkankers.

Ten slotte reflecteerden we in **Hoofdstuk 8** op de methoden en resultaten die in dit proefschrift worden gepresenteerd en hoe deze kunnen worden toegepast of uitgebreid in toekomstig werk. Daarnaast beschreven we de implicaties van verschillende technologische ontwikkelingen en belangrijke uitdagingen die nog reesteren voor de toekomst.