



Universiteit
Leiden
The Netherlands

RNA splicing in breast cancer progression

Koedoot, E.

Citation

Koedoot, E. (2019, December 17). *RNA splicing in breast cancer progression*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/81820>

Version: 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/1887/81820>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/81820> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Koedoot, E.

Title: RNA splicing in breast cancer progression

Issue Date: 2019-12-17

Nederlandse Samenvatting

1 op de 8 vrouwen krijgt borstkanker voordat de leeftijd van 85 jaar bereikt wordt en daarmee is borstkanker de meest voorkomende vorm van kanker in vrouwen wereldwijd. Daarnaast is borstkanker ook de meest dodelijke kankersoort in vrouwen, voornamelijk veroorzaakt door uitzaaiingen naar onmisbare organen zoals de lever en longen. Borstkanker kan worden onderverdeeld in verschillende subtypen door het beoordelen van genetische profielen, maar ook op basis van zogenaamde hormoonreceptoren. Deze receptoren zijn eiwitten die zich aan het celoppervlak bevinden en signalen van hormonen buiten de cel doorgeven aan andere eiwitten binnen de cel. Triple-negatieve borstkanker (TNBK) heeft zeer lage niveaus van verschillende hormoonreceptoren en kan daardoor, in tegenstelling tot de andere subtypen, niet behandeld worden met anti-hormonale therapieën. Hierdoor bestaat de huidige therapie voor TNBK nog steeds uit het chirurgisch verwijderen van de tumor in combinatie met chemotherapie en/of bestraling. Ondanks dat TNBK maar 15-20% van het totale aantal borstkankerpatiënten uitmaakt, is dit subtype verantwoordelijk voor het grootste gedeelte van borstkanker gerelateerde uitzaaiingen en sterfte. Dit proefschrift had als doel de onderliggende processen betrokken bij het uitzaaien van TNBK te ontrafelen en hierdoor bij te dragen aan nieuwe doelgerichte therapieën voor TNBK.

Het uitzaaien van TNBK is een complex proces dat bestaat uit meerdere stappen. Nadat de borsttumor is gevormd, kunnen kankercellen eigenschappen verkrijgen die het mogelijk maken uit de tumor te migreren en in de buurt van bloedvaten te komen. Tegelijkertijd stimuleren tumorcellen de groei van zowel bloed- als lymfevaten de tumor in. Dit is noodzakelijk om de tumor van voedingsstoffen te voorzien en biedt tegelijkertijd een mogelijkheid te ontsnappen. Kankercellen kunnen vervolgens binnendringen in de bloedvaten, reizen in de bloedsomloop en tenslotte de bloedbaan verlaten in andere organen zoals de longen of de lever. Wanneer de kankercellen hier weer beginnen met groeien is er sprake van een uitzaaiing. In het hierboven beschreven proces zien we twee processen die cruciaal zijn voor het uitzaaien van tumoren: 1) het bewegen (of migreren) en 2) het vermenigvuldigen van tumor cellen. Tumormigratie is betrokken bij vele stappen gedurende het ontstaan van uitzaaiingen, zoals de migratie uit de borsttumor, het binnendringen van de bloedsomloop en het verlaten van de bloedbaan. Het vermenigvuldigen van tumorcellen is essentieel voor het uitgroeien van zowel de borsttumor als de uitzaaiing en is het meest bestudeerde proces in het kankerveld. Om het uitzaaien van TNBK te remmen, wilden we daarom nieuwe genen ontdekken die specifiek TNBK celmigratie of celgroei kunnen voorkomen.

In **hoofdstuk 2** hebben we voor bijna 4200 genen onderzocht of ze betrokken zijn bij het migreren van twee verschillende soorten TNBK cellen. Voor beide soorten cellen ontdekten we ruim 100 genen die de migratie reguleren. Een groot deel van deze genen was geassocieerd met een verhoogde kans op het ontwikkelen van uitzaaiingen in borstkanker patiënten. Uiteindelijk hebben we 3 van deze genen verder onderzocht (BPTF, BUD31 en PRPF4B), omdat ze 1) onmisbaar waren voor tumormigratie in verschillende soorten TNBK cellen, 2) vaak vermenigvuldigd waren in borsttumoren in vergelijking met normaal borstweefsel en 3) sterk geassocieerd waren met een verhoogde kans op het ontwikkelen van uitzaaiingen. De

combinatie van deze 3 punten maakt deze genen aantrekkelijk voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën. Het weghalen van zowel BPTF, BUD31 als PRPF4B resulteerde in verlaagde niveaus van genen die een belangrijke rol vervullen in TNBK migratie. Tenslotte was PRPF4B essentieel voor het ontwikkelen van TNBK uitzaaiingen in een muismodel, waardoor we PRPF4B als een belangrijke kandidaat zien voor de ontwikkeling van nieuwe TNBK geneesmiddelen.

Van zowel PRPF4B en BUD31 is bekend dat ze een rol spelen in RNA splicing. In een (tumor)cel bevat DNA de code voor RNA, dat vervolgens wordt gebruikt voor het produceren van eiwitten, de werkers van de cel. Voordat het RNA kan worden afgelezen en een eiwit kan worden geproduceerd, moeten niet-coderende stukken uit het RNA worden geknipt en de coderende stukken aan elkaar worden geplakt. Dit proces heet RNA splicing en wordt uitgevoerd door 244 verschillende eiwitten (ook wel splicing factoren genoemd), waaronder PRPF4B en BUD31. Het feit dat zowel PRPF4B en BUD31 sterk gerelateerd waren aan het uitzaaien van TNBK, deed ons besluiten om ons verder te concentreren op de rol van RNA splicing in borstkanker.

In **hoofdstuk 3** hebben we de huidige kennis over splicing factoren in de ontwikkeling en het uitzaaien van borstkanker samengevat. Ondanks dat het onderzoek naar splicing pas recent gestart is, zijn al 5 van de 10 belangrijkste kenmerken van kanker gerelateerd aan splicing factoren. Daarnaast liet onze analyse zien dat 4 andere kenmerken geassocieerd zijn met de niveaus van specifieke splicing factoren in borsttumoren. Dit suggereert dat splicing een voorname rol speelt in borstkanker ontwikkeling en progressie.

In **hoofdstuk 4** hebben we de regulatie van splicing factoren in borsttumoren bestudeerd. We ontdekten groepen van splicing factoren die gezamenlijk gereguleerd worden en gerelateerd zijn aan agressieve tumoren die sneller uitzaaien. Naast borstkanker, werden deze groepen splicing factoren ook gezamenlijk gereguleerd in meer dan 20 andere kankersoorten. Dit suggereert dat RNA splicing een algemene rol speelt bij borstkankerprogressie, maar ook in heel veel andere kankersoorten.

Om de rol van splicing factoren in TNBK verder bloot te leggen, hebben we in **hoofdstuk 5** voor alle 244 splicing factoren onderzocht of ze betrokken zijn bij het migreren van TNBK cellen. Hier hebben we een specifieke set van factoren ontdekt (waarvan SMNDC1 en SRSF7 de belangrijkste) die essentieel zijn voor het migreren van TNBK cellen, zonder de celgroei te remmen. Vermindering van de niveaus van deze splicing factoren remde de migratie van TNBK cellen door klassieke migratie processen aan te pakken. Naast de rol van deze factoren in TNBK migratie in cellen gekweekt in het lab, ontdekten we dat deze factoren waarschijnlijk ook in patiënten belangrijk zijn voor de ontwikkeling van uitzaaiingen; hogere niveaus van de geselecteerde splicing factoren waren gerelateerd aan een grotere kans op het ontstaan van uitzaaiingen in borstkanker patiënten.

In **hoofdstuk 6** hebben we onderzocht of splicing factoren betrokken zijn bij het andere proces essentieel voor het ontwikkelen van uitzaaiingen: kanker celgroei. We ontdekten negen splicing factoren (AQR, CRNKL1, MFAP1, NHP2L1, PRPF8, SF3B1, SNRPD2, SNRPD3 en SNRPF)

die na remming zorgden voor verminderde celgroei in verschillende soorten TNBK cellen. Bijna al deze negen factoren werkten samen in hetzelfde complex en gebruikten hetzelfde mechanisme om dit effect te bereiken; de regulatie van eiwitten die belangrijk zijn voor een efficiënte celdeling. Remming van deze splicing factoren ontregelde de celdeling, waardoor cellen ontstonden met een dubbele hoeveelheid DNA, wat uiteindelijk leidde tot celdood. Voor één van deze negen splicing factoren (SF3B1) is al een remmer ontwikkeld die momenteel wordt getest in de kliniek. Behandeling van TNBK cellen met deze remmer leidde inderdaad ook ontregelde celdeling, verminderde celgroei en uiteindelijk celdood. Daarnaast waren de niveaus van deze specifieke eiwitten betrokken bij celdeling ook geassocieerd met tumorgroei in borstkankerpatiënten. Ontregeling van deze eiwitten door remming van onze selectie van splicing factoren zou daarom een potentiële strategie zijn om borstkankergroei te remmen in patiënten.

In alle eerder beschreven hoofdstukken werd de rol van RNA splicing in borstkanker onderzocht door het gebruik van TNBK cellen gekweekt in plastic platen in een tweedimensionale (2D) omgeving. Een verminderde toepasbaarheid van de resultaten van deze experimenten zou kunnen komen doordat de daadwerkelijke tumor in de patiënt zich in een driedimensionale (3D) omgeving bevindt en in contact staat met andere weefsels. In het lab kunnen we een 3D situatie nabootsen door de cellen op te kweken in een gel samenstelling in plaats van op plastic platen. Om de verschillen tussen 2D en 3D kweekcondities en de vertaalslag van experimenten naar patiënten beter te begrijpen, hebben we in **hoofdstuk 7** verschillende soorten borstkankercellen met verschillende agressiviteit opgekweekt in 2D en 3D condities en hierin de RNA niveaus van alle genen bekeken. We ontdekten dat de agressiviteit van sommige cellijnen in 3D kon worden toegedicht aan verhoging van de niveaus van een specifieke set van genen. Daarnaast hebben we de RNA niveaus van de cellen gekweekt in 2D en 3D condities vergeleken met de RNA niveaus in borsttumoren van patiënten. Voor TNBK cellen, waren de cellen gekweekt in 3D het best geassocieerd met patiënttumoren. Echter, de associatie bleek erg afhankelijk te zijn van het onderzochte proces of het type borstkanker. Daarom hebben we een bioinformatica-strategie ontwikkeld om de beste kweekomstandigheden te selecteren voor het specifieke proces en borstkankertype waarin de toekomstige onderzoeker geïnteresseerd is. Dit zou de klinische vertaling van experimenten uitgevoerd op het laboratorium moeten verbeteren.

In **hoofdstuk 8** worden alle bevindingen uit dit proefschrift samengevat en wordt een overzicht gegeven van de implicaties en toekomstperspectieven van de uitgevoerde studies. De niveaus van splicing factoren zijn vaak verhoogd in TNBK en geassocieerd met het ontstaan van uitzaaiingen. Daarom zouden remmers van deze factoren veelbelovende medicijnen kunnen zijn om de borstkanker-gerelateerde sterfte te verminderen. De meeste remmers die momenteel beschikbaar zijn specifiek gericht op één splicing factor (SF3B1). In onze studies, hebben we verschillende andere splicing factoren ontdekt die interessant zijn voor geneesmiddel ontwikkeling. Hoewel nieuwe remmers voor verschillende splicing factoren recent ontdekt zijn, zijn er nog geen remmers voor onze factoren beschikbaar. Toekomstige ontwikkeling van remmers voor deze nieuwe set van factoren is een potentiële strategie om TNBK uitzaaiingen te voorkomen.

In het algemeen draagt dit proefschrift bij aan het begrip van onderliggende processen belangrijk voor het uitzaaien van TNBK. We hebben een database aangelegd van genen die betrokken zijn bij het migratiegedrag van TNBK en systematisch de rol van alle splicing factoren in de essentiële stappen in het uitzaaien van TNBK geëvalueerd. Daarnaast hebben we enkele splicing factoren ontdekt die veelbelovende therapeutische doelwitten zouden kunnen zijn voor het bestrijden van TNBK uitzaaiingen en uiteindelijk borstkanker-gerelateerde sterfte te verminderen.