



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Precision modeling of breast cancer in the CRISPR era

Annunziato, S.

Citation

Annunziato, S. (2020, January 16). *Precision modeling of breast cancer in the CRISPR era*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/82703>

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/1887/82703>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/82703> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Annunziato, S.

Title: Precision modeling of breast cancer in the CRISPR era

Issue Date: 2020-01-16

Nederlandse samenvatting

De moleculaire mechanismen die een gezonde cel ertoe aanzetten kwaadaardig te worden, worden gevoed door (epi) genetische veranderingen in zogenaamde aansturende genen (d.w.z. omdat ze het transformatieproces aansturen). Het is de heilige graal van precisie geneeskunde om deze genetische afhankelijkheden te identificeren en ze op een persoonlijke manier te gebruiken met geneesmiddelen. Dit is een ontmoedigende taak gebleken, omdat tumoren worden gekenmerkt door genetische instabiliteit en een mutatie fenotype. Deep sequencing studies hebben aangetoond dat elke tumor eigenlijk een heterogene massa is met slechts enkele aansturende genen die gebruikt kunnen worden voor interventie. De-convolutie van deze complexiteit vereist niet alleen krachtige bio-informatica, maar ook functionele validatie in modelorganismen om robuuste relaties tussen genotypes en fenotypes vast te stellen. Genetisch gemanipuleerde muismodellen (GEMM's) zijn zeer geschikt voor dit doeleinde omdat ze een intact immuun systeem hebben en het mogelijk is om oncogenen en tumorsuppressorgenen (TSG) te verstoren. Bovendien kunnen GEMM's worden gebruikt voor preklinisch testen van nieuwe geneesmiddelen (en combinaties van) tegen kanker en om mogelijke mechanismen van resistentie tegen geneesmiddelen te identificeren.

Het laboratorium van prof. Jos Jonkers heeft zich de afgelopen 15 jaar gericht op de genetische dissectie van kankerontwikkeling, therapierespons en resistentie in muismodellen van borstkanker. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van alle gegenereerde modellen en hun toepassingen, variërend van patiënt-afgeleide xenotransplantaten (PDXs) tot kiemlijn en somatische GEMM's van borstkanker.

Somatische GEMM's zijn gebaseerd op de directe modificatie van volwassen borstepitheel na intraductale injectie van virale vectoren die zijn ontworpen voor genetische manipulatie. **Hoofdstuk 3** beschrijft hoe deze somatische benadering kan worden gebruikt om invasief lobulair carcinoom (ILC) te modelleren, een subtype van borstkanker dat wordt gekenmerkt door verlies van E-cadherine. Lentivirale vectoren werden uitgerust om het Cre recombinase, het CRISPR / Cas9-systeem of beide tot expressie te brengen, en geïnjecteerd in vrouwelijke muizen die voorwaardelijke allelen van het *Cdh1*-gen dragen, coderend voor E-cadherine. Met deze benadering waren we in staat om endogene TSG's (bijvoorbeeld *Pten*) in ILC-initiërende cellen te verstoren en daardoor hun rol in dit subtype van borstkanker te evalueren. We hebben ook waargenomen dat injectie van Cas9-coderende lentivirale vectoren sterke Cas9-specifieke immuunresponsen opwekt, die kunnen worden omzeild door een GEMM te gebruiken waar Cas9 alleen in mammaklier tot expressie komt.

Somatische modellering van kanker met behulp van CRISPR-technologie *in vivo* is een revolutionaire techniek gebleken. Deze techniek stelt ons in staat om een snelle functionele validatie uit te voeren van kandidaat-kankergenen die afkomstig zijn van voorwaartse genetische screens en catalogi van mutaties in menselijke tumoren. In **Hoofdstuk 4** hebben we bijvoorbeeld transposon gemedieerde insertiemutagenese toegepast om genen te identificeren die samenwerken met het verlies van E-cadherine bij de ontwikkeling van ILC. Wederzijds exclusieve en veel voorkomende transposon-inserties werden geïdentificeerd in *Myh9*, *Ppp1r12a*, *Ppp1r12b* en *Trp53bp2*. Deze genen zijn vaak gemuteerd in menselijke ILC patiënten en betrokken bij de regulatie van het actine-cytoskelet. Met behulp van somatische benaderingen hebben we alle vier genen snel kunnen valideren als aanstuurders ILC in een E-cadherine deficiënte achtergrond.

De volgende vier hoofdstukken richten zich op drievoudige negatieve borstkanker (TNBC), een borsttumorsubtype dat wordt gekenmerkt door slechte prognose en beperkte behandelingsopties. Deze tumoren zijn vaak defect in homologe recombinatie, een proces wat gebruikt wordt om dubbelstrengs DNA-breuken te repareren. We gebruikten kiemlijn en somatische GEMM's met conditionele *Brca1*- en *Trp53*-allelen, om tumoren te genereren die genomische instabiliteit in de tumoren van patiënten recapituleren. Opvallend is dat we hebben geconstateerd dat gemanipuleerde overexpressie van MYC in dit model een grote invloed heeft op het profiel van het aantal DNA-kopieën in de tumoren. Vergelijking met oncogenomische analyses van muizen met humane tumoren onthulde nieuwe genen betrokken bij tumorigenese en MCL1 als een nieuwe therapeutische kwetsbaarheid in dit subtype van borstkanker. De resultaten van deze studie worden gepresenteerd in **Hoofdstuk 5**.

In **Hoofdstuk 6** hebben we de mogelijkheden van somatische engineering verder uitgebreid door *in vivo* nucleotide-aanpassing in borstkliepitheel op te zetten. Hoewel de gebruikelijke CRISPR gebaseerde verstoring van genen een snelle manier biedt voor het inactiveren van kandidaat-TSG's, is het niet in staat om klinisch relevantie missense mutaties te modelleren. Daarom hebben we knock-in muizen gegenereerd met Cre-voorwaardelijke expressie van een cytidine-nucleotide-editor en gekeken of we missense mutaties kunnen generen in belangrijke kankergenen. Bij intraductale toediening van sgRNA-coderende vectoren kunnen we puntmutaties met hoge efficiëntie in één of meerdere endogene genen bewerkstelligen. Met dit model kunnen nu het effect van deze klinisch relevante punt mutaties op borstkanker ontwikkeling beoordelen.

In **Hoofdstuk 7** hebben we de organoid technologie gebruikt om op efficiënte wijze driedimensionale celkweken af te leiden van BRCA1 / 2-proficiënte en -deficiënte TNBC's uit onze GEMM's. Deze organoid kweken van muizen kunnen gemakkelijk *in*

vitro genetisch worden gemodificeerd (bijvoorbeeld met CRISPR-Cas9-methoden) en geven tumoren bij orthotope transplantatie die de kenmerken van de oorspronkelijke GEMM-tumoren behouden. Het gemak waarmee ze kunnen worden aangepast, maakt borsttumor-organoids van muizen een krachtig hulpmiddel voor het bestuderen van tumorbiologie en geneesmiddelresistentie. In **Hoofdstuk 8** hebben we *in vitro* functionele genetische screening uitgevoerd en het verlies van het CST-complex geïdentificeerd als een nieuw mechanisme waardoor BRCA1-deficiënte tumorcellen kunnen ontsnappen aan de synthetisch letale effecten van PARP-blokkade. We hebben de leden van dit complex *in vitro* in 3D organoids individueel uitgeschakeld en hun rol in de resistentie tegen PARP-remmers gevalideerd in tumoren gegenereerd met deze organoid kweken.