



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cancer chess: molecular insights into PARP inhibitor resistance

Barazas, M.

Citation

Barazas, M. (2021, December 14). *Cancer chess: molecular insights into PARP inhibitor resistance*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3247064>

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/1887/3247064>

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

Nederlandse Samenvatting

Behandeling-op-maat heeft veel potentie om de effectiviteit van kankertherapie te verbeteren. Door vooraf de genetische achtergrond van een tumor te bepalen kan de behandeling worden afgestemd op de specifieke eigenschappen en kwetsbaarheden van de tumor. Dit kan onder andere worden gedaan door gebruik te maken van synthetisch letale interacties. Synthetische letaliteit wil zeggen dat de uitschakeling van één van twee genen afzonderlijk geen effect heeft op de overleving van de cel, maar dat celdood ontstaat wanneer deze beide genen tegelijkertijd worden uitgeschakeld. Een goed voorbeeld van synthetische letaliteit is de interactie tussen BRCA en Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP), waarbij door een defect in het BRCA1 of BRCA2 gen een aanzienlijke gevoeligheid ontstaat voor de remming van PARP (PARPi). Zowel in dragers als in niet-dragers van een BRCA1/2 mutatie is deze gevoeligheid specifiek voor tumorcellen door het verlies van het tweede wild type allel in tumorcellen. De therapeutische potentie van deze interactie wordt geïllustreerd door de fractie van tumoren die een langdurige respons vertonen. Echter, deze langdurige responsen zijn niet universeel aangezien er in een substantiële fractie van de tumoren resistentie ontstaat tegen PARPi. De kennis over mechanismen die kunnen verklaren waardoor sommige BRCA1-deficiënte cellen de gevolgen van PARPi kunnen tolereren is beperkt. Volgens het huidige model ontstaan er door PARPi indirect dubbel-strengs breuken (DSB) in het DNA. De meest precieze manier om deze DSBs te repareren is via het foutloze DSB-reparatiemechanisme homologe recombinatie (HR). Een belangrijke stap in HR is eind-resectie van DSBs: het “opeten” van één streng DNA, waardoor er een enkelstrengs DNA overhang ontstaat. Deze resectie wordt gestimuleerd door BRCA1, en maakt het mogelijk om twee DSB-uiteinden nauwkeurig aan elkaar te koppelen door gebruik te maken van homologie tussen het enkelstrengs DNA aan het uiteinde en intact DNA. In afwezigheid van BRCA1 zijn cellen echter afhankelijk van het meer foutgevoelige DSB-reparatiemechanisme niet-homologe eind-ligatie (NHEJ). Eind-ligatie is het “aan elkaar plakken” van twee DSB-uiteinden. Wanneer dit incorrect gebeurt, bijvoorbeeld door twee niet aan elkaar horende uiteinden te koppelen, kunnen er toxische herschikkingen ontstaan in het DNA die uiteindelijk tot celdood kunnen leiden. Hiervan wordt gebruik gemaakt om tumorcellen te doden door middel van PARPi.

Recentelijk is aangetoond dat in BRCA1-deficiënte cellen het 53BP1-complex een belangrijke rol speelt in het ontstaan van toxische herschikkingen van PARPi-geïnduceerde DSBs door eind-resectie te blokkeren. Normaal wordt ongewenste 53BP1 activiteit beperkt door BRCA1. Door het 53BP1-pad te inactiveren in BRCA1-deficiënte cellen (BRCA1;53BP1-deficiënt) wordt HR-activiteit deels herstelt en ontstaat er resistentie tegen PARPi. Echter, aangezien noch 53BP1 noch de andere factoren in het 53BP1-pad (RIF1 en REV7/MAD2L2) direct DNA kunnen binden is het lang onduidelijk gebleven hoe eind-resectie geblokkeerd wordt. Deze achtergrond wordt verder uitgelegd in het introducerende **Hoofdstuk 1** en vormt de basis voor de rest van dit

proefschrift, dat tot doel heeft om meer inzicht te verschaffen in de mechanismen die ervoor zorgen dat BRCA1-deficiënte cellen ongevoelig worden voor de door PARPi-geïnduceerde DNA-schade. Het proefschrift heeft tevens tot doel om mogelijke nieuwe kwetsbaarheden van deze PARPi-resistente cellen in kaart te brengen. Dit zou uiteindelijk tot een rationele aanpak kunnen leiden om resistente tumoren te behandelen, of idealiter, te anticiperen op resistentie nog voordat dit verschijnt.

Genetische muis modellen (GEMMs) zijn zeer belangrijk in het kankeronderzoek.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de technologische vooruitgang die is geboekt in GEMMs van borstkanker. Dit overzicht richt zich tevens op de biologische inzichten die door middel van GEMMs zijn verkregen, onder andere met betrekking tot het ontstaan van kanker, alsmede hoe deze kankermodellen worden gebruikt om de respons op therapie en het ontstaan van resistentie te bestuderen. Bij dit laatste is de evolutionaire component die GEMMs bevatten cruciaal aangezien dit het ontstaan van resistentie in humane tumoren nabootst. Echter, het in GEMMs uitschakelen en bestuderen van de invloed van individuele genen op therapierespons wordt bemoeilijkt door het lage slagingspercentage om *in vitro* cellijnen te creëren uit GEMM-tumoren, en vice versa, de ineffectiviteit van deze cellijnen om *in vivo* tumoren te genereren. Deze beperkingen werden weggenomen door eerder beschreven 3D-kweekcondities toe te passen op borstkankercellen uit het *K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}* (KB1P) muismodel. Hiermee was het mogelijk om tumor-organoïden te groeien uit KB1P muistumoren. Dit wordt beschreven in **Hoofdstuk 3**. Het genetisch aanpassen van deze tumor-organoïden en terugplaatsing hiervan in muizen, maakte het mogelijk om tijds- en arbeidseffectief het effect van individuele genen op therapierespons te bestuderen. Dit is geïllustreerd door de systematische uitschakeling van bekende factoren uit het 53BP1-pad, wat in dit hoofdstuk is gepresenteerd. Deze techniek wordt tevens gebruikt in de navolgende hoofdstukken, waaronder voor de *in vivo* validatie van de rol van ASCIZ (**Hoofdstuk 4**). De ASCIZ-DYNLL1 as stimuleert de oligomerisatie en rekrutering van 53BP1 naar DSB-uiteinden, en daarmee 53BP1-gedreven NHEJ. Uitschakeling van deze as resulteert in verminderde gevoeligheid van BRCA1-deficiënte cellen voor PARPi.

Om nieuwe PARPi resistentiemechanismen te ontdekken zijn (genoom-brede) CRISPR/SpCas9 screens uitgevoerd in BRCA1-deficiënte cellen, hierbij gebruikmakend van cel overleving onder druk van PARPi als eindpunt. Deze screens hebben meerdere interessante factoren opgeleverd, waardoor nieuwe inzichten zijn verkregen in de regulatie van eind-resectie en DSB-metabolisme. **Hoofdstuk 5** beschrijft een nieuw complex dat enkelstrengs DNA kan binden en wat bestaat uit drie factoren, C20ORF196 (SHLD1), FAM35A (SHLD2) en FLJ26957/CTC534A2.2 (SHLD3), die gezamenlijk het Shieldin-complex vormen. Er is aangetoond dat het Shieldin-complex naar plekken van DNA-schade wordt gebracht door 53BP1-RIF1-REV7 en verlies van Shieldin bootst de fenotypen na die beschreven zijn voor andere factoren uit het 53BP1-pad. Directe koppeling van het Shieldin-complex aan RNF8 maakte de rol van 53BP1-RIF1-REV7 overbodig en verhinderde de reactivering van HR in BRCA1;53BP1-deficiënte cellen. Dit

toonde aan dat Shieldin de effector is in van het 53BP1-complex. De genetische screens identificeerde nog een ander ssDNA bindend complex die de interactie tussen BRCA1 en PARP1 beïnvloedt, te weten het CST-complex. Het CST-complex bestaat uit CTC1, STN1 en TEN1 en is bekend als regulator van de lengte van telomeren. Het gaat de eind-resectie van telomeren tegen door POLA te rekruteren en vervolgens een DNA-synthese reactie te starten. De validatie van deze hit is het onderwerp van **Hoofdstuk 6**. Het uitschakelen van CST in BRCA1-deficiënte tumorcellen herstelde (ten dele) HR-activiteit en leidde tot PARPi-resistentie *in vitro* en *in vivo*. Bovendien stimuleerde CST de activiteit van NHEJ op disfunctionele telomeren en faciliteerde het door NHEJ-gedreven klasse-switch recombinitie. Deze data demonstreren dat CST ook actief is op DSBs buiten telomeren. Gezamenlijk beschrijven hoofdstuk 5 en 6 de tot dusver ontbrekende schakel tussen het 53BP1-pad en de regulatie van DSB eind-metabolisme.

In **Hoofdstuk 7** wordt de kennis over resistentiemechanismen benut om naar nieuwe kwetsbaarheden van PARPi-resistente BRCA1-deficiënte cellen te zoeken. Het mogelijk bestaan van een kwetsbaarheid was verwacht gezien de rol van het 53BP1-pad in de reparatie van DSBs via NHEJ. BRCA1;53BP1-deficiënte cellen zijn kruisresistent tegen onder andere topoisomerase-remmers, welke, analoog aan PARP-remmers, indirect DSBs genereren. Echter, dit hoofdstuk laat zien dat BRCA1;53BP1-deficiënte cellen een verhoogde gevoeligheid hebben voor radiotherapie (RT). Dit benadrukt dat in de context van RT de partiële restoratie van HR niet opweegt tegen het verlies van het 53BP1-pad. In overeenstemming hiermee bleek HR-activiteit niet hersteld te zijn in een cohort radiotherapie-resistente BRCA1-deficiënte GEMM-tumoren, ondanks het feit dat BRCA1-deficiëntie leidde tot hypergevoeligheid tegen RT. De verhoogde gevoeligheid voor RT van BRCA1;53BP1-deficiënte cellen ten opzichte van BRCA1-deficiënte cellen is dusdanig dat *in vitro* en *in vivo* modellen aantoonde dat in gemengde populaties de aanwezigheid van BRCA1;53BP1-deficiënte tumorcellen afneemt ten opzichte van BRCA1-deficiënte tumorcellen. Dit laat zien dat er mogelijkheden zijn om PARPi-resistente BRCA1-deficiënte tumoren waarin het 53BP1-pad is uitgeschakeld te behandelen.

Gezien de veelbelovende klinische respons op PARPi en de noodzaak om resistentie in de kliniek te behandelen, wordt de BRCA1/PARP1 interactie veel bestudeerd. Het hoge aantal onafhankelijke publicaties omtrent PARPi-resistentiemechanismen getuigen van de snelheid waarin het veld vordert. Het proefschrift eindigt met een algemene discussie over de uitstaande vragen omtrent de reparatie van door PARPi ontstane DNA-schade en DSB-eind-regulatie in **Hoofdstuk 8**. Tot slot worden strategieën beschreven om de toepassing van PARPi verder te verbreden en verbeteren. Samenvattend biedt dit proefschrift inzicht in het schaakspel tegen kanker in de context van PARPi-behandeling van BRCA1-deficiënte tumoren.