



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Disrupting the transcriptional machinery to combat triple-negative breast cancer

Noord, V.E. van der

Citation

Noord, V. E. van der. (2024, April 25). *Disrupting the transcriptional machinery to combat triple-negative breast cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3748390>

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/1887/3748390>

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

Nederlandse samenvatting: Het bestrijden van triple-negatieve borstkanker door in te grijpen in het transcriptieproces

Borstkanker treft ongeveer 1 op de 8 vrouwen, en is daarmee de meest voorkomende vorm van kanker bij vrouwen wereldwijd. Bovendien leidt het tot de meeste sterfgevallen door kanker in deze groep. Borstkanker kan worden onderverdeeld in verschillende subtypen op basis van de aanwezigheid van drie eiwitten in de tumor: de oestrogeenreceptor, de progesteronreceptor en de humane epidermale groeifactor receptor 2. De afhankelijkheid van deze eiwitten vormen de basis voor gerichte behandelingen, zoals hormoontherapie. Echter, in 10-20% van de gevallen is er sprake van triple-negatieve borstkanker (TNBK), waarbij deze drie eiwitten bijna niet tot expressie komen. TNBK kan niet met hormonale therapie worden behandeld en heeft een zeer slechte prognose. Ondanks talloze onderzoeken blijft het aanbod van effectieve TNBK-behandelingen beperkt. De meest gebruikelijke behandeling bestaat uit chemotherapie en het chirurgisch verwijderen van de tumor, gevolgd door bestraling. Voor sommige patiënten met TNBK zijn ook de zogeheten PARP-remmers en immuuntherapie als meer gerichte therapieën mogelijk. Deze verschillende behandelingen zijn echter niet altijd effectief en vaak is er sprake van een terugval, waarbij TNBK zich vaak al verspreid heeft naar andere organen en zeer moeilijk te behandelen is. Het is daarom van groot belang om betere therapieën voor TNBK te ontwikkelen.

Dit proefschrift heeft zich dan ook gericht op het vinden van nieuwe en gerichte behandelingen voor TNBK. In **hoofdstuk 1** worden huidige TNBK-behandelingen, mogelijke nieuwe aangrijpingspunten en redenen waarom TNBK vaak resistent wordt tegen deze behandelingen besproken. TNBK wordt veroorzaakt door veranderingen in het DNA, die via transcriptie (het vertalen van genen in het DNA naar RNA) en translatie (het vertalen van RNA naar eiwitten) kunnen leiden tot een verstoring van de expressie van bepaalde eiwitten. Sommige van deze eiwitten spelen een belangrijke rol in de groei en overleving van TNBK en worden daarom vaak beschouwd als potentiële doelwitten voor gerichte therapie. Echter, tot nu toe hebben geteste remmers van deze eiwitten slechts in heel beperkte mate geleid tot effectieve antikankertherapie, voornamelijk vanwege al bestaande of snel ontwikkelende resistentie. Het begrijpen van resistentiemechanismen kan deze therapieën effectiever maken, bijvoorbeeld door (combinatie)therapieën te ontwikkelen die de resistentie kunnen overwinnen of door biomarkers te identificeren die kunnen voorspellen welke patiënten mogelijk beter zullen reageren.

In **hoofdstuk 2** hebben we verschillende geneesmiddelen getest op 20 TNBK-cellijnen om de diversiteit van TNBK en potentiële resistentiemechanismen te weerspiegelen. We hebben een panel van 378 remmers gebruikt die verschillende kinases (een eiwit die de functie van andere eiwitten beïnvloedt, meestal activeert) in de cel remmen. De expressie of activiteit van kinases is namelijk vaak veranderd in kanker. Hoewel kinases gezien worden als aantrekkelijke doelwitten voor nieuwe geneesmiddelen, ontdekten we dat de meeste TNBK-cellijnen resistent waren tegen remmers hiervan.

Appendix

Vervolgens hebben we ons gericht op twee klassen van kinase-remmers: MEK- en Akt-remmers. De signaleringsroutes van MEK en Akt kunnen belangrijk zijn voor de groei en overleving van kankercellen. In TNBK zijn deze dan ook vaak actiever, bijvoorbeeld door mutaties van de bijhorende genen. In onze studie observeerden we dat sommige TNBK-cellijnen goed reageerden op ofwel MEK- ofwel Akt-remmers, terwijl andere resistent waren voor beide. Door te kijken naar de activiteit van de twee bijhorende signaalroute in deze verschillende cellijnen, kwamen wij erachter dat verhoogde activiteit van deze routes een sterk verband hield met de gevoeligheid voor deze remmers. Verhoogde activiteit van de Akt-route was vereist voor gevoeligheid voor Akt-remmers, en verhoogde activiteit van de MEK-route was vereist voor gevoeligheid voor MEK-remmers. Echter, cellijnen die resistent waren voor beide remmers, hadden vaak ook een verhoogde activiteit van tenminste één van deze routes. We ontdekten dat een verhoogde expressie van genen die betrokken zijn bij de celcyclus geassocieerd was met deze dubbele resistentie. Daarnaast ontdekten we dat deze cellijnen wel gevoelig waren voor remmers van cycline-afhankelijke kinasen (CDK's). Dit onderzoek suggereert dus dat CDK's potentiële doelwitten zijn voor TNBK, en biedt bovendien inzicht in biomarkers voor gevoeligheid voor Akt- en MEK-remmers in TNBK.

CDK's kunnen zowel de celcyclus als de transcriptie van RNA beïnvloeden. CDK7, CDK8, CDK9, CDK12 en CDK13 zijn CDK's die voornamelijk betrokken zijn bij de transcriptie van genen en het verder verwerken van het resulterende RNA. De afgelopen jaren hebben deze met-transcriptie-geassocieerde CDK's (tCDK's) veel aandacht gekregen als potentiële aangrijpingspunten voor therapie, alhoewel op dit moment nog geen van deze therapieën is goedgekeurd voor de behandeling van kankerpatiënten. Het is bekend dat deze tCDK's andere eiwitten die betrokken zijn bij transcriptie kunnen reguleren. Dit is voornamelijk RNA polymerase II, die het daadwerkelijke proces van het produceren van RNA uitvoert, en daarmee lijken deze tCDK's dus essentiële functies in de globale transcriptie uit te oefenen. In **hoofdstuk 3** beschrijven wij echter dat voorgaande onderzoeken suggereren dat het remmen van deze tCDK's voornamelijk de productie van specifieke eiwitten kan beïnvloeden. Veel van deze eiwitten zijn betrokken bij progressie van kanker, en zijn vaak door genetische veranderingen verstoord in TNBK. Zo lijkt CDK7 voornamelijk betrokken bij de expressie van verschillende eiwitten belangrijk voor celdeling, en voor de expressie van genen met een regulatie via zogeheten "super-enhancers" (deze reguleren de activiteit van genen en kunnen veel transcriptiefactoren binden die voor een hoge activiteit zorgen). CDK7 activeert bijvoorbeeld de expressie van het belangrijke MYC oncogene sterk, die in veel TNBK tumoren een rol speelt. CDK8 lijkt de activiteit van deze super-enhancers ook te reguleren, weliswaar op een andere manier. Bovendien beïnvloedt CDK8 de activiteit van bepaalde transcriptiefactoren en kan het immuuncellen beïnvloeden via een eiwit genaamd STAT1. CDK9 en CDK12, en in mindere mate CDK13, lijken belangrijk te zijn voor de expressie van eiwitten die betrokken zijn bij celdeling, alhoewel dit waarschijnlijk op een andere manier wordt gereguleerd dan door CDK7. CDK12 speelt ook een rol bij het reguleren van de cellulaire respons op

DNA-schade, wat vaak al verstoord is in TNBK. Dus, in plaats van het remmen van individuele verstoorde eiwitten, waartegen TNBK vaak resistentie ontwikkeld, kan het remmen van tCDK's de productie van meerdere van deze verstoorde eiwitten tegelijk verminderen.

Hoewel eerder onderzoek de regulatie van specifieke genen door tCDK's in verschillende kankercellen van verschillende vormen van kanker heeft geïdentificeerd, is het nog niet altijd duidelijk of deze processen ook worden verstoord in TNBK-cellen. Doordat de genregulatie door de verschillende tCDK's vaak niet in parallel zijn onderzocht, is de functie van individuele tCDK's vaak lastig met elkaar te vergelijken. Bovendien zijn de meeste bevindingen verkregen met tCDK-remmers die niet specifiek zijn voor één CDK, wat het moeilijk maakt om ze specifiek aan één tCDK te koppelen. Omdat deze kennis nodig is voor het ontwikkelen van een effectieve therapeutische strategie tegen TNBK die gebruik maakt van deze remmers, hebben we in **hoofdstuk 4 t/m 6** deze kwesties verder onderzocht.

In **hoofdstuk 4** onderzochten we de effectiviteit van nieuwe CDK9-remmers en hun combinatie met EGFR-remmers. EGFR is een eiwit dat onder andere de celgroei stimuleert na activatie en vaak verhoogd tot expressie komt in TNBK. CDK9-remmers bleken effectief in het remmen van de groei van TNBK-cellen, en de combinatie met EGFR-remmers versterkte dit effect op een synergetische manier. De CDK9-remmers veroorzaakten een herprogrammering van transcriptie, waarbij vooral genen betrokken bij celdeling lager tot expressie kwamen. Bovendien daalde de expressie van veel transcriptiefactoren. Sommige van deze transcriptiefactoren bleken essentieel te zijn voor de groei van TNBK-cellen, wat hen ook mogelijke nieuwe doelwitten voor therapie maakt, en onderliggend zou kunnen zijn aan de effecten van CDK9-remmers op proliferatie. Vervolgens hebben we onderzocht of de combinatie van een CDK9-remmer met een EGFR-remmer ook effectief is in het remmen van transcriptieactiviteit en groei van TNBK tumoren in muismodellen. Alhoewel de combinatie van deze remmers synergetisch de activiteit van RNA polymerase II en de tumor groei verminderde, leidde dit ook tot bijwerkingen in deze muizen. Opvallend was dat deze bijwerkingen niet gezien werden bij het behandelen van muizen zonder tumor, wat mogelijk kan duiden op dat de bijwerkingen werden veroorzaakt door effecten in de tumor. Daarnaast is het mogelijk dat de bijwerkingen werden veroorzaakt door andere aangrijpingspunten van de CDK9-remmer, aangezien deze niet volledig selectief is voor CDK9, en ook andere CDK's kan remmen. Dit onderzoek heeft dus een belangrijke basis gelegd voor de potentie van CDK9-remmers, met name in combinatie met EGFR-remmers, en toont de noodzaak van gebruik van selectieve CDK-remmers verder aan. Om deze reden hebben wij ons onderzoek verder gericht op het begrijpen van de synergetische reactie tussen EGFR- en CDK9-remmers, en op het gebruik van remmers die nog selectiever zijn voor bepaalde tCDK's.

Hoofdstuk 5 richtte zich op het begrijpen van het mechanisme achter de synergetische interactie tussen deze EGFR- en tCDK-remmers. We ontdekten eerst dat deze synergie niet beperkt was tot EGFR- en CDK9-remmers, maar ook

Appendix

voorkwam bij andere kinase-remmers (naast EGFR-remmers) en combinaties met CDK7- en CDK12/13-remmers (naast CDK9-remmers). Door zowel systematisch de CDK12/13-remmer te combineren met het uitschakelen van alle humane genen, en het effect daarvan op cel proliferatie te bestuderen, als het onderzoeken van verschillen in genexpressie tussen resistente en gevoelige cellijnen, identificeerden we “ABCG2” dat geassocieerd was met resistentie tegen CDK12/13-remmers. ABCG2 is een transporteiwit dat geneesmiddelen uit de cel kan pompen, wat gebruikt kan worden door kankercellen om resistentie te ontwikkelen. We ontdekten dat bepaalde kinase-remmers de werking van ABCG2 konden remmen en daarmee de gevoeligheid voor CDK-remmers konden verhogen. Dit onderzoek toont dus niet alleen het mechanisme aan van de synergetische interacties tussen deze twee soorten remmers, maar ook het belang van het effect van ABC-transport voor veel tCDK remmers. Bovendien laat het zien dat, onder bepaalde omstandigheden, vele kinase remmers het transporteren van andere geneesmiddelen sterk kunnen beïnvloeden, wat mogelijkheden biedt voor combinatietherapie, en mogelijk ook een verklaring kan zijn voor andere, eerder beschreven, synergetische interacties tussen geneesmiddelen.

Hoofdstuk 6 onderzocht het effect van selectieve uitschakeling en remming van de tCDK's op celdeling en genexpressie in TNBK. We ontdekten dat vooral CDK9 en CDK12 belangrijk zijn voor de deling van TNBK-cellen en het behoud van diens transcriptieprogramma's. Hoewel de uitschakeling van zowel CDK9 als CDK12 leidde tot verstoring van genexpressieprocessen, waren de betrokken genen grotendeels verschillend. Naast een verminderde expressie van verschillende genen, merkten we op dat juist ook veel genen verhoogd tot expressie kwamen, vooral genen die betrokken zijn bij energieproductie (door “mitochondriën”) en vorming en afbraak van eiwitten (door “ribosomen” en “proteasomen”) voor zowel CDK9 als CDK12 uitschakeling. Deze verhoogde expressie is mogelijk een overlevingsmechanisme als reactie op cellulaire stress van TNBK-cellen. Genen die lager tot expressie kwamen, waren voornamelijk betrokken bij de celcyclus. Bovendien had de uitschakeling van CDK12 een sterker effect op genen betrokken bij de respons op DNA-schade, terwijl CDK9-uitschakeling meer leidde tot lagere expressie van genen die het immuunsysteem reguleren. CDK7-uitschakeling resulteerde vooral in verminderde expressie van genen die betrokken zijn bij celdeling, terwijl CDK8-uitschakeling juist een hogere expressie van immuun-gerelateerde genen opleverde. Tenslotte leidde CDK13-uitschakeling tot een verhoging van genen die betrokken zijn bij differentiatie, een proces wat ervoor zorgt dat een cel een bepaalde functie krijgt, bijvoorbeeld bijhorend bij een specifiek orgaan. Deze bevindingen wijzen op de verschillende gespecialiseerde rollen van tCDK's in het reguleren van transcriptie in TNBK-cellen en bieden mogelijkheden voor gerichte therapieën.

Het werk in dit proefschrift beschrijft dus het potentieel voor het aangrijpen van tCDK's die transcriptie reguleren, met name CDK9 en CDK12, in TNBK. Het beschrijft dat vele kinase remmers gericht op andere aangrijpingspunten ineffectief zijn, en dat deze tCDK's aangegrepen kunnen worden om indirect verschillende van de onderliggende veranderingen in TNBK te kunnen aangrijpen. Daarnaast biedt het inzicht

in het verbeteren van de effectiviteit van tCDK-remmers door combinatietherapie en het begrijpen van de bijhorende mechanismes. Het onderzoek benadrukt ook de verschillende rollen van tCDK's in TNBK-cellen bij het reguleren van specifieke transcriptieprogramma's. Toekomstig onderzoek is nog nodig om dit volledig te begrijpen, en om uiteindelijk deze tCDK-remmers daadwerkelijk toe te kunnen passen voor patiënten met TNBK. Over het geheel genomen vormt dit proefschrift een belangrijke basis voor verder onderzoek en de ontwikkeling van doelgerichte TNBK-therapieën die zich richten op CDK's die transcriptie reguleren.