

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:  
<http://hdl.handle.net/1887/79947>

**Author:** He, J.

**Title:** Uncovering vulnerabilities in triple-negative breast cancer

**Issue Date:** 2019-10-31

## Samenvatting

### Het blootleggen van kwetsbaarheden bij triple negatieve borstkanker

Triple negatieve borstkanker (“triple-negative breast cancer”, TNBC) vormt een klein subtype (~ 15%) van borstkanker, maar veroorzaakt de meeste sterfgevallen door borstkanker. Zoals gedefinieerd door de afwezigheid van oestrogeen receptor (ER) en progesteron receptor (PR) expressie en humane epidermale groeifactor receptor 2 (HER2) overexpressie, is TNBC niet te genezen door hormoonreceptor- of op HER2-gerichte therapieën. Bovendien is TNBC zeer heterogeen en agressief. Tot op heden blijft chemotherapie de standaard bij de behandeling van TNBC. Ondanks een goede eerste response op reguliere chemotherapie, vertoont TNBC vaak intrinsieke of verworven resistentie tegen deze geneesmiddelen en keert vervolgens terug in lokale en distale organen. Doelgerichte therapieën worden al lang bestudeerd voor de behandeling van TNBC, maar vertonen zelden bevredigende klinische resultaten. Daarom is het begrijpen van de ingewikkelde biologische basis die ten grondslag ligt aan TNBC ongevoeligheid voor gerichte middelen en het definiëren van nieuwe therapeutische mogelijkheden van het grootste belang. Het doel van de studies in dit proefschrift was om systematisch de gen en kinase afhankelijkheden van resistente TNBC cellen te identificeren en nieuwe effectieve doelgerichte therapieën voor TNBC te onthullen als monotherapie of in combinatie met goedgekeurde kinase remmende medicijnen.

**Hoofdstuk 2** maakte gebruik van een op FRET (fluorescentie resonantie energieoverdracht) gebaseerde imaging techniek op grote schaal (“high-throughput”) om kwantitatief ERK en AKT dynamische activiteit te monitoren in MEK-remmer (MEKi) resistente en AKT-remmer (AKTi) resistente TNBC cellen na behandeling met 378 kinase remmers. Door een wiskundig model af te leiden om proliferatieve responses te profileren en ERK- en AKT-gebaseerde dynamische kinase-activiteitanalyse te integreren, onthulden wij unieke kinase afhankelijkheden van RTK / MAPK- en PI3K / AKT-routes die duidelijk kunnen worden aangegrepen in de resistente TNBC cellen. Zo reageerden MEKi-resistente cellen op remmers van de PI3K-pathway terwijl deze ongevoelig waren voor EGFR-gerichte remmers. In tegenstelling waren de AKTi-resistente cellen gevoelig voor EGFR / MAPK-sigtaaltransductie-blokkade, maar vertoonden deze resistentie tegen mTOR-remmers. Dit werk biedt nieuwe mogelijkheden om effectieve therapeutische kinasedoelen in resistente kankercellen te onderzoeken, evenals de werkzaamheid van geneesmiddelen en mogelijke niet-doelgerichte (“off-target”) effecten van klinisch gebruikte geneesmiddelen te beoordelen.

Door het uitvoeren van een siRNA-screening op schaal van het gehele kinase repertoire (kinoom), identificeerde **Hoofdstuk 3** specifieke en kwetsbare kinasedoelen in

EGFRi en mTORi-resistente TNBC cellen. Farmacologische remming van deze doelen onderdrukte de proliferatie van TNBC cellen in verschillende resistente scenario's sterk, en dit benadrukte het potentieel van het aanpakken van deze kinase kwetsbaarheden om deze moeilijk te behandelen ziekte te bestrijden. Bovendien werd een kinoombrede siRNA-screening uitgevoerd in EGFRi-resistente TNBC cellen in combinatie met lapatinib behandeling. Deze combinatie screen onderzocht de synthetisch letale interacties van genen met EGFR-gerichte remming. De resultaten hebben aangetoond dat een Src-familie lid FYN TNBC resistentie veroorzaakte tegen EGFR-kinase gerichte remming door het negatief te reguleren van de EGFR / PI3K / AKT-signaleringsroute. Het aangrijpen van FYN bevrijdde de activiteit van onderliggende PI3K- en AKT-signaleringsroutes, wat verklaart waarom deze gecombineerde aangrijpingsstrategie geneesmiddel resistentie tegen EGFR / PI3K / AKT-signaling terugdraait in kankercellen met verhoogde EGFR-expressie, zoals TNBC.

In **Hoofdstuk 4** werd een high-throughput screening uitgevoerd op een grote set van kinase remmers over ~20 TNBC cellijnen die representatief zijn voor zes belangrijke TNBC subtypen. Het onderzoek toonde een zwakke correlatie aan van moleculaire subtypen van TNBC en hun proliferatieve reacties op verschillende kinase remmers. Deze studie onderzocht welke geneesmiddelcombinaties deze resistentie tegen mTOR-remmers kunnen overwinnen. De aangrijpingspunten van de geïdentificeerde synergetische kinase remmers werden voorspeld door op cheminformatica-gebaseerd onderzoek en werden verder functioneel gevalideerd door siRNA-gemedieerde gensuppressie. De AEE788 + rapamycin combinatie die in dit hoofdstuk werd geïdentificeerd, vertegenwoordigt een nieuwe therapeutische strategie om TNBC te bestrijden. De verschillende aangrijpingspunten van AEE788 zijn onthuld en verklaren de synergetische interactie met rapamycin en andere soortgelijke mTOR-remmers (rapalogen). De combinatie, door zich te richten op meerdere kinasen, ondersteunt niet alleen geremde MAPK-activiteit, maar onderdrukt ook effectief mTOR-signaling, waardoor synergetische antiproliferatieve effecten in TNBC worden opgewekt. Bovendien zijn de bevindingen complementair aan het momenteel gepubliceerde spectrum van aangrijpingspunten van het kinase-medicijn AEE788. **Hoofdstuk 4** onthulde de synergetische effecten van de multi-kinase gerichte remmer AEE788 op de behandeling van rapalogen in TNBC's. Cheminformatica-geleide voorspelling van de aangrijpingspunten en experimentele validatie hiervan toonden verder de polyfarmacologische mechanismen aan die aan de synergie ten grondslag liggen.

Men denkt dat genetische veranderingen evolutionair geselecteerd worden tijdens de initiatie, ontwikkeling en progressie van kanker. Meer dan 80% van de TNBC tumoren vertoont een TP53-mutatie, wat een belangrijke reden is voor het veroorzaken van genetische instabiliteit in deze ziekte. Inzichtelijke analyse van genomische sequenties

("sequencing") bij (triple negatieve) borstkanker met behulp van bio-informatica, kan daarom mogelijk nieuwe therapeutische aangrijpingspunten identificeren. **Hoofdstuk 5** heeft gebruik gemaakt van het robuuste ADMIRE-algoritme om het aantal genetische kopieën en genexpressieprofielen in een reeks triple-negatieve tumoren te analyseren. Uit deze analyse kwamen 148 kandidaat genen, die mogelijk TNBC celgroei en proliferatie aansturen. Een siRNA-screening van deze genen heeft, naast bekende EGFR- en MYC-oncogenen, het belang van nieuwe aandrijvende ("driver") genen verder gevalideerd, waaronder ASAP1, die ook een hoge amplificatiefrequentie en genexpressie in TNBC-cohorten vertoonden. Van belang is dat een hoog niveau van ASAP1-expressie correleert met een slechte prognose bij patiënten met TNBC. Een TempO-Seq-gebaseerde kwantitatieve analyse van RNA moleculen ("RNA sequencing") liet zien dat het nieuwe TNBC driver-gen ASAP1 verschillende cytokine- en apoptose-sigtaalcomponenten reguleert die significant geassocieerd zijn met TNBC prognose. Dit ondersteunt verder de potentie van ASAP1 als een therapeutisch doelwit voor deze agressieve ziekte.

Samenvattend heeft het in dit proefschrift gepresenteerde werk belangrijke kinase-verslavingen van resistente TNBC cellen blootgelegd, belangrijke regulatoren geïdentificeerd die resistentie tegen kinase remmers verlenen, en nieuwe driver-genen en combinatorische aangrijpingsstrategieën ontdekt om resistentie tegen geneesmiddelen te ondermijnen. Deze studies bieden nieuwe inzichten in de moleculaire basis die ten grondslag ligt aan de reacties op klinische kinase-geneesmiddelen van TNBC tumoren en bieden potentiële therapeutische aangrijpingsstrategieën aan voor deze slecht behandelbare vorm van borstkanker.