
Algemene samenvatting

Resistentie tegen chemotherapeutica is nog steeds een groot en onopgelost probleem in de kliniek, omdat de meeste patiënten overlijden door tumoren die niet meer reageren op enige vorm van chemotherapie (1). Het onderzoek in dit proefschrift betreft voornamelijk mechanismen van verkregen resistentie tegen topoisomerase remmers. Deze kankermedicijnen maken deel uit van vele chemotherapie behandelingen, inclusief die tegen borstkanker. We maakten gebruik van het *K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}* muismodel voor erfelijke borstkanker (2) om moleculaire mechanismen van verkregen chemoresistentie te onderzoeken. De spontane tumoren, die in dit genetisch gemanipuleerd muismodel ontstaan, werden getransplanteerd in de mammaplantjes van wildtype muizen met dezelfde genetische achtergrond en behandeld met de maximaal getolereerde medicijn dosis om de klinische situatie zo goed mogelijk na te bootsen. Het identificeren van resistentiemechanismen tegen topoisomerase remmers in een goed handelbaar muismodel en het ontwikkelen van effectieve strategieën om resistentie te overwinnen kan bijdragen aan het verbeteren van de chemotherapie voor BRCA1-geassocieerde borstkanker patiënten.

Hoofdstuk 1

BRCA1 dysfunctie leidt tot een gebrek in DNA reparatie via homologe recombinatie en als gevolg hiervan tot overgevoeligheid voor dubbelstrengs DNA breuken. Dit tumor-specifieke DNA reparatie gebrek kan als een Achilles hiel functioneren en in hoofdstuk 1 hebben we dit vermeende synergistisch lethale effect geëvalueerd, gebruikmakend van de topoisomerase I (Top1) remmer topotecan als monotherapie of in combinatie met poly(ADP-ribose) polymerase remming door olaparib. Alle 20 geteste tumoren waren topotecan-gevoelig, maar er was substantiële heterogeniteit in de tumorreactie op behandeling. Ondanks het feit dat topotecan therapie de muisoverleving verhoogde, verkregen alle tumoren uiteindelijk resistentie. Van de verschillende bekende resistentiemechanismen gerapporteerd voor gekweekte tumorcellijnen (3-5) hebben we slechts twee geïdentificeerd in ons muismodel: een verhoogde expressie van de efflux transporter ABCG2 en opvallend verlaagde eiwitniveau's van de drug target Top1 (zonder veranderde mRNA niveau's). Tumor-specifieke genetische ablatie van *Abcg2* verhoogde significant de algehele overleving van de topotecan behandelde dieren ($P < 0.001$), wat de *in vivo* relevantie van ABCG2 voor topotecan resistentie in een nieuwe benadering bevestigde. Geen van de 11 *Abcg2^{-/-};Brca1^{-/-};p53^{-/-}* tumoren werd geëlimineerd, ondanks de afwezigheid van ABCG2, een vermeende marker voor tumor-initiërende cellen (6, 7), zelfs niet door

de topotecan – olaparib combinatie. We vonden dat olaparib therapie substantieel de topotecan toxiciteit verhoogde in ons muismodel en we suggereren dat dit ook zou kunnen gebeuren in patienten.

Hoofdstuk 2

In hoofdstuk 2 hebben we de experimentele polyethyleen glycol-geconjugeerde ('pegylated') SN38 verbinding EZN-2208 getest als een nieuwe benadering om *BRCA1*-gemuteerde tumoren, die ABCG2 tot expressie brengen, te behandelen. EZN-2208 resulteerde in xenograaf muismodellen in hogere en langdurigere tumorblootstelling aan de irinotecan metaboliet SN38 vergeleken met de pro-drug irinotecan zelf (8-10). We vonden dat de EZN-2208 therapie resulteerde in meer uitgesproken en duurzamere reacties van de ABCG2-positieve tumoren dan topotecan of irinotecan therapie. We hebben ook tumor-specifieke ABCG2 remming door Ko143 geëvalueerd in *Abcg2*^{-/-} dieren, waarin tumoren met topotecan-geïnduceerde ABCG2 expressie waren getransplanteerd. Toevoeging van Ko143 resulteerde in een bescheiden verhoging van de algehele overleving van deze dieren, maar gaf niet de tumorreacties zoals geobserveerd na EZN-2208 therapie. Onze resultaten suggereren dat 'pegylation' van Top1 remmers een nuttige strategie zou kunnen zijn om efflux transporter-gemedieerde resistentie te omzeilen en hun effectiviteit in de kliniek te verbeteren.

Hoofdstuk 3

De fumitremorgin C analoog Ko143 is een potente en selectieve remmer van de 'ATP-binding cassette' transporter ABCG2. Om de *in vivo* resistentiestudies van hoofdstuk 2 te ondersteunen, hebben we een gevoelige en selectieve methode ontwikkeld voor de quantificatie van Ko143 in plasma en tumor monsters, gebruikmakend van fumitremorgin C als interne standaard. Monstervoorbehandeling met behulp van vloeistof-vloeistof extractie in diethyl ether resulteerde in een 50% opbrengst uit humaan en muis plasma. Voorbehandelde monsters werden gescheiden met behulp van 'reversed-phase high-performance liquid chromatography' en gemeten met fluorescentie detectie bij 295 nm excitatie en 350 nm emissie golflengtes. Scherpe chromatografische pieken werden verkregen met een 5 μ m GraceSmart C18 kolom. De mobiele fase bestond uit methanol : 10 mM ammonium acetaat pH 5.0 (62:38 v/v), aangeleverd met een loopsnelheid van 0.2 mL/min. Acceptabele accuratesse en precisie van $\pm 15\%$ werden bereikt binnen het lineair dynamische bereik van de kalibratielijns (2-500 ng/mL) voor humane en muis plasma monsters.

Muis tumorweefsel monsters maakten het gebruik van een kalibratiecurve, bereid in dezelfde matrix, noodzakelijk vanwege de lagere opbrengst van 40% uit deze matrix. Accuratesse en precisie waren toen binnen het algemeen geaccepteerde bereik van $\pm 15\%$ voor bioanalytische methoden. Ko143 was stabiel in humaan plasma tot 3 herhaalde vries-dooi cycli en bij kamertemperatuur tot 72 uur. Ko143 in muisplasma bij kamertemperatuur werd echter snel afgebroken door esterase activiteit, wat voorkomen kon worden door het verzamelen van bloed monsters in natrium fluoride-bevattende buizen en incuberen van monsters op ijs tijdens de monstervoorbehandeling.

Hoofdstuk 4

'P-glycoprotein (P-gp)' is de meest bestudeerde 'ATP-binding cassette' transporter, bekend vanwege het veroorzaken van multidrug resistentie. De relevantie van P-gp voor klinische resistentie blijft echter controversieel (11). We vonden van te voren dat bescheiden verhoogde expressieniveaus van de muis P-gp genen *Mdr1a* (*Abcb1a*) en *Mdr1b* (*Abcb1b*) voldoen om resistentie tegen de topoisomerase II (TOP2) remmer doxorubicin te veroorzaken (12). Omdat P-gp-gemedieerde resistentie in borstkanker patienten wel eens zeldzaam zou kunnen zijn, hebben we in hoofdstuk 4 P-gp-onafhankelijke doxorubicin resistentiemechanismen bestudeerd. Voor dit doel hebben we het *K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}* muismodel gekruist op een P-gp-deficiënte achtergrond om tumoren te genereren, waarin de functie van beide muis P-gps volledig is uitgeschakeld (13). Deze tumoren waren overgevoelig voor de maximaal getolereerde doxorubicin dosis wanneer zij getransplanteerd werden in P-gp-proficiënte muizen en verkregen doorgaans geen drug resistentie. Slechts wanneer we de dosis tot 50% verlaagden, vond resistentie uiteindelijk plaats. Tumoren, die resistent werden tegen de 50% dosis, lieten een stabiel resistentiephenotype zien na transplantatie in nieuwe acceptor dieren en verkregen vervolgens resistentie tegen de volledige dosis. Als bekend resistentiemechanisme identificeerden we lage TOP2 α mRNA en eiwitniveaus in ongeveer de helft van de 50% dosis-resistente tumoren. Sommige tumoren zonder TOP2 α verlaging waren desalniettemin kruisresistent tegen de TOP2 remmer etoposide, maar niet tegen de TOP1 remmer topotecan. 'RNA sequencing' analyse van deze tumoren bracht geen *Top2* mutaties aan het licht, maar in plaats daarvan verlaagde *Top2 β* RNA niveaus als een mogelijk alternatief resistentiemechanisme voor sommige tumoren. Onze resultaten suggereren dat lage expressie en niet mutatie van de 'drug target' TOP2

veel gevallen van P-gp-onafhankelijke doxorubicin resistentie verklaart in ons muismodel.

Hoofdstuk 5

Remming van poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is een veelbelovende strategie voor de behandeling van homologe recombinatie-deficiënte tumoren zoals BRCA1-deficiënte borstkanker. We hebben eerder gerapporteerd dat BRCA1-deficiënte muis mammatumoren resistentie kunnen verkrijgen tegen de klinische PARP remmer olaparib via activering van de drug efflux transporter P-gp (14). In hoofdstuk 5 zetten we nieuwe mechanismen van resistentie tegen PARP remming uiteen, die niet verklaard kunnen worden door P-gp-gemedieerde drug efflux, residuele BRCA1 activiteit of herstel van BRCA1 functie (15). Voor dit doel hebben we het *K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}* muismodel gebruikt, waarin mammatumoren optreden die een grote en irreversibele *Brca1* mutatie bevatten op een P-gp-deficiënte achtergrond. Tumor-specifieke genetische inactivatie van P-gp verhoogde de lange termijn olaparib reactie van de muis mammatumoren, maar deze tumoren verkregen uiteindelijk resistentie tegen PARP remming. In ongeveer 25% van de bestudeerde gevallen werd dit veroorzaakt door gedeeltelijk herstel van homologe recombinatie ten gevolge van verlies van 53BP1 expressie (16, 17). Een belangrijke bevinding was dat resistentie tegen PARP remming werd geminimaliseerd door lange termijn behandeling met de nieuwe PARP remmer AZD2461, een slecht P-gp transportsubstraat. Samengenomen suggereren onze resultaten dat herstel van homologe recombinatie een belangrijk mechanisme voor resistentie tegen PARP remming is in BRCA1-deficiënte mammatumoren en dat het risico van terugkomst van de BRCA1-deficiënte tumoren na behandeling effectief kan worden geminimaliseerd door AZD2461 te gebruiken, een nieuwe PARP remmer met lage affiniteit voor P-gp.

Hoofdstuk 6

Er is gesuggereerd dat de 'ATP-binding cassette' (ABC) transporters ABCG2 en ABCB1, naast hun rol in drug resistentie, cellen ook zouden kunnen beschermen tegen een breed spectrum aan substanties, die tumorontwikkeling kunnen bevorderen. Phyto-oestrogenen of hun metabolieten zijn substraten van deze transporters en de invloed van deze verbindingen op borstkankerontwikkeling is controversieel. De oestrogeen-achtige eigenschappen zouden aan de ene kant tumorontwikkeling kunnen versnellen, terwijl de gezondheidsbevorderende eigenschappen aan de

andere kant tumorontwikkeling zouden kunnen antagoneren. We hebben dit probleem als een zijlijn project in hoofdstuk 6 benaderd, gebruikmakend van het nieuwere generatie *K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}* muismodel voor *BRCA1*-gemuteerde borstkanker. We hebben ook het vermogen van phyto-oestrogenen bestudeerd om mammatumorontwikkeling in geovariectomeerde dieren te herstellen. De genesteïne en resveratrol blootstelling van premaligne mamma epitheelcellen zou beïnvloed kunnen worden door de ABC transporters ABCB1 en ABCG2. Er is aangetoond dat ABCG2-deficiënte dieren verhoogde resveratrol en genesteïne plasma niveaus hebben vergeleken met wildtype dieren (18-20). We hebben derhalve ook mammatumorontwikkeling onderzocht in *Abcb1a/b^{-/-};K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}* en *Abcg2^{-/-};K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}* dieren om de genesteïne en resveratrol blootstelling van de mamma epitheelcellen te verhogen. Vergeleken met het ABC transporter-proficiënte model lieten de ABCG2-deficiënte dieren een gereduceerde mediane tumorlatentie van 17.5 dagen zien ($P < 0.001$), terwijl geen significant verschil werd geobserveerd voor de ABCB1-deficiënte dieren. Noch genesteïne noch resveratrol veranderde deze latentie reductie in de *Abcg2^{-/-};K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}* dieren. Ovariectomie resulteerde in bijna volledig verlies van mamma tumorontwikkeling, dat niet werd hersteld door genesteïne of resveratrol. Onze resultaten laten zien dat ABCG2 bijdraagt aan de bescherming van genetisch instabiele epitheelcellen tegen carcinogenese. Diëten, die hoge niveaus van genesteïne of resveratrol bevatten, hadden geen effect op mamma tumorontwikkeling, of muizen ABCG2 misten of niet. Omdat genesteïne en resveratrol slechts de huid tumorontwikkeling van geovariectomeerde dieren vertraagden, concluderen we dat deze phyto-oestrogenen geen effectieve modulators zijn van mamma tumorontwikkeling in ons muismodel.

Samengenomen laten de resultaten van dit proefschrift zien dat genetisch gemodificeerde muismodellen nuttige gereedschappen zijn om drug resistentie tegen zowel standaard kankermedicijnen zoals topoisomerase remmers als nieuwere chemotherapeutica zoals PARP remmers te bestuderen. Aangezien er steeds meer moleculaire inzichten over (borst)kanker beschikbaar komen door de recente ontwikkelingen, die kanker (epi)genomen en proteomen met een hoge resolutie in kaart trachten te brengen, zullen de muismodellen, die kanker in mensen modelleren, ongetwijfeld steeds verder mee evolueren. Ik ben ervan overtuigd dat deze modellen nuttig zijn om het doel van de optimalisering van de kankertherapie in de kliniek te bereiken (21).

Referenties

1. Borst P. Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what? *Open Biol.* 2012;2:120066.
2. Liu X, Holstege H, van der Gulden H, Treur-Mulder M, Zevenhoven J, Velds A, et al. Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:12111-6.
3. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:789-802.
4. Pommier Y, Pourquier P, Urasaki Y, Wu J, Laco GS. Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance. *Drug Resist Updat.* 1999;2:307-18.
5. Rasheed ZA, Rubin EH. Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. *Oncogene.* 2003;22:7296-304.
6. Bleau AM, Hambarzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, et al. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell.* 2009;4:226-35.
7. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:275-84.
8. Pastorino F, Loi M, Sapra P, Becherini P, Cilli M, Emionite L, et al. Tumor regression and curability of preclinical neuroblastoma models by PEGylated SN38 (EZN-2208), a novel topoisomerase I inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2010;16:4809-21.
9. Sapra P, Kraft P, Mehlig M, Malaby J, Zhao H, Greenberger LM, et al. Marked therapeutic efficacy of a novel polyethylene glycol-SN38 conjugate, EZN-2208, in xenograft models of B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2009;94:1456-9.
10. Sapra P, Zhao H, Mehlig M, Malaby J, Kraft P, Longley C, et al. Novel delivery of SN38 markedly inhibits tumor growth in xenografts, including a camptothecin-11-refractory model. *Clin Cancer Res.* 2008;14:1888- 96.
11. Amiri-Kordestani L, Basseville A, Kurdziel K, Fojo AT, Bates SE. Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug Resist Updat.* 2012;15:50-61.
12. Rottenberg S, Nygren AO, Pajic M, van Leeuwen FW, van der Heijden I, van de Wetering K, et al. Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:12117-22.

13. Rottenberg S, Vollebergh MA, de Hoon B, de Ronde J, Schouten PC, Kersbergen A, et al. Impact of intertumoral heterogeneity on predicting chemotherapy response of BRCA1-deficient mammary tumors. *Cancer Res.* 2012;72:2350-61.
14. Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, et al. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:17079-84.
15. Drost R, Bouwman P, Rottenberg S, Boon U, Schut E, Klarenbeek S, et al. BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance. *Cancer Cell.* 2011;20:797-809.
16. Bouwman P, Aly A, Escandell JM, Pieterse M, Bartkova J, van der Gulden H, et al. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17:688-95.
17. Bunting SF, Callen E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, et al. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell.* 2010;141:243-54.
18. Alfaras I, Perez M, Juan ME, Merino G, Prieto JG, Planas JM, et al. Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) in the bioavailability and tissue distribution of trans-resveratrol in knockout mice. *J Agric Food Chem.* 2010;58:4523-8.
19. Enokizono J, Kusuhara H, Sugiyama Y. Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Mol Pharmacol.* 2007;72:967-75.
20. van de Wetering K, Burkon A, Feddema W, Bot A, de Jonge H, Somoza V, et al. Intestinal breast cancer resistance protein (BCRP)/Bcrp1 and multidrug resistance protein 3 (MRP3)/Mrp3 are involved in the pharmacokinetics of resveratrol. *Mol Pharmacol.* 2009;75:876-85.
21. Bouwman P, Jonkers J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:587-98.