

DUTCH SUMMARY / NEDERLANDSE SAMENVATTING

Proteomics voor experimenteel borstkankeronderzoek

Ontwikkeling van kandidaat eiwitmarkers voor klinisch gebruik

Borstkanker is één van de belangrijkste gezondheidsproblemen met wereldwijd jaarlijks meer dan één miljoen vrouwen bij wie deze diagnose wordt gesteld. Borstkanker zou gemakkelijker kunnen worden behandeld, wanneer de ziekte in een vroeg stadium wordt herkend. Een beter behandelingsresultaat kan ook worden bereikt, wanneer subtypes kunnen worden geïdentificeerd waarvoor een specifieke therapie beschikbaar is (zogenaamde *therapie op maat*). Om een vroege diagnose en goede stratificatie voor behandeling mogelijk te maken is er behoefte aan betere biomarkers. Een biomarker is een meetbare entiteit, die informatie geeft over een biologische of pathologische toestand. In dit proefschrift hebben we ons vooral gericht op eiwitmarkers die kunnen worden gebruikt bij een subtype borstkanker, dat een specifiek defect heeft in een mechanisme dat schade aan het genetische materiaal herstelt. Deze vorm van borstkanker komt vooral voor bij vrouwen met erfelijke borstkanker, maar ook wel bij vrouwen met zogenaamde sporadische borstkanker. Vrouwen met erfelijke borstkanker zijn relatief jong. Vanwege de dichtheid van het borstklierweefsel op jonge leeftijd is borstkanker moeilijker te detecteren bij mammografische screening dan bij vrouwen in de menopauze. De vroege opsporing van borstkanker met behulp van een gevoelige biomarkertest zou kunnen leiden tot een meer effectieve behandeling en prognose van borstkanker.

Vrouwen die drager zijn van een mutatie in het BRCA1 of BRCA2 gen hebben een verhoogde kans op het ontwikkelen van erfelijke borstkanker. Mutaties zijn veranderingen in het genetische materiaal (ook wel DNA genoemd) die ervoor kunnen zorgen dat een eiwit (waarvan het bouwplan gecodeerd is in het DNA) zijn functie niet of minder goed uitvoert. Zo zijn de eiwitten die gecodeerd worden door de BRCA1 en BRCA2 genen verantwoordelijk voor een relatief foutloos herstel van schade aangebracht aan het DNA. DNA in een cel is opgeslagen in twee kopieën in de celkern. BRCA1, BRCA2 en aanverwante eiwitten herstellen fouten in de beschadigde kopie op basis van de onbeschadigde kopie. Dit mechanisme wordt ook aangeduid met de term "herstel op basis van *homologe recombinatie* (HR)". Wanneer er een mutatie is in BRCA1, BRCA2 of andere genen die betrokken zijn bij dit herstelproces, is er uiteindelijk een veel vluigere opeenstapeling van DNA schade vergeleken met mensen die geen drager zijn van dergelijke mutaties. Opeenstapeling van deze DNA schade in vooral het borstklierweefsel resulteert in een hoge kans op borstkanker. Bij deze vrouwen is de kans op eierstokkanker ook vergroot. Bij een groot aantal borsttumoren met een erfelijk defect in het BRCA1 gen is er geen verhoogde aanwezigheid van de oestrogenreceptor, de progesteronreceptor en het HER2 eiwit. Deze vorm van borstkanker, ook wel "*triple-negative*

R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
R9
R10
R11
R12
R13
R14
R15
R16
R17
R18
R19
R20
R21
R22
R23
R24
R25
R26
R27
R28
R29
R30
R31
R32
R33
R34
R35
R36
R37
R38
R39

D

R1 *breast cancer*” (TNBC) genoemd, wordt daarom niet behandeld met anti-hormonale of anti-
R2 HER2 geneesmiddelen. In het algemeen gedraagt TNBC zich agressief in de zin van snelle
R3 uitzaaiing op afstand en heeft daarmee een slechtere prognose dan de andere subtypes
R4 borstkanker. Bij de sporadische vorm van borstkanker kan ook sprake zijn van een minder
R5 goede werking van het BRCA1 eiwit zonder dat een erfelijke mutatie aanwezig is.

R6 Recent onderzoek heeft aangetoond dat borstkanker (zowel erfelijke als sporadische),
R7 waarbij het BRCA eiwit niet of minder goed functioneert gevoelig is voor geneesmiddelen
R8 die het DNA beschadigen. Ook middelen die indirect schade aanbrengen aan het DNA lijken
R9 veelbelovend. Een voorbeeld van deze laatste zijn middelen die interfereren met de werking
R10 van het PARP enzym (PARP remmers). Het PARP enzym probeert in borstkankercellen met
R11 een BRCA defect alsnog DNA schade te herstellen. Eén van de PARP remmers (olaparib)
R12 wordt momenteel getest in klinische studies bij vrouwen die drager zijn van een mutatie in
R13 het BRCA1 of BRCA2 gen. In dit proefschrift hebben wij ons vooral gericht op het vinden van
R14 eiwitmarkers die tumoren met een BRCA1 defect herkennen en kunnen worden ingezet voor
R15 het vroeg opsporen van kanker. Zulke eiwitmarkers kunnen misschien ook worden gebruikt
R16 bij het selecteren van tumoren met een HR deficiëntie voor een betere en innovatieve
R17 behandeling.

R18
R19 Voor dit proefschrift hebben we eiwit expressieprofielen in kaart gebracht van tumoren
R20 ontstaan in genetische gemodificeerde muizen. Met deze strategie hadden we als doel
R21 om eiwit markers te vinden voor humane borstkanker die een deficiëntie van het BRCA1
R22 gen vertonen. Grootschalige eiwitonderzoek (ook wel “proteomics” genoemd) is een
R23 onderzoeksveld dat zoveel mogelijk eiwitten in een monster probeert te identificeren
R24 en te kwantificeren. Een grote diversiteit aan biologisch materialen kan onderzocht
R25 worden: een stukje (tumor) weefsel, specifiek geïsoleerde celtypes of celcompartimenten,
R26 uitgescheiden eiwitten of een lichaamsvloeistof. Voor het proteomics onderzoek van borst
R27 tumorweefsel in dit proefschrift hebben we gebruik gemaakt van een snelle en gevoelige
R28 meettechniek, te weten massaspectrometrie. Proteomics analyse van tumorweefsel van
R29 genetisch gemodificeerde muizen die op een gecontroleerde manier een BRCA1-deficiënte
R30 borsttumor ontwikkelen bieden een mogelijkheid om eiwitmarkers te vinden voor BRCA1-
R31 deficiënte tumoren bij mensen. Deze muis “tumormodellen” bieden ook de mogelijkheid om
R32 nieuwe behandelingen te testen. Naast het zoeken naar geschikte eiwitmarkers voor BRCA1
R33 deficiëntie werd ook een begin gemaakt met validatie van veelbelovende eiwitmarkers op
R34 coupes van humane borstkankerweefsels.

R35
R36 In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift hebben we een proteomics analyse uitgevoerd op
R37 borsttumoren van muizen die wel of geen BRCA1 defect hadden. Deze analyse werd
R38 ingezet om inzicht te verkrijgen in de onderliggende biologie van BRCA1 dysfunctie en om
R39

eiwitmarkers te identificeren die tumoren kunnen herkennen met een BRCA1 deficiëntie. Via bioinformatica analyse van eiwitfuncties en eiwitinteracties in eiwitcomplexen kwam naar voren, dat eiwitten die verantwoordelijk zijn voor het herstel van DNA en de daarmee geassocieerde processen, verhoogd aanwezig waren in de tumoren met een BRCA1 defect. Omdat het BRCA1 eiwit betrokken is bij het relatief foutloos herstel van DNA suggereert deze bevinding dat een aantal alternatieve herstelmechanismes compenseren voor dit verlies. Op basis van deze analyse van de eiwitten met verhoogde expressie in de tumoren met een BRCA1 defect konden we een profiel of “handtekening” vinden van 45 eiwitten die een weerspiegeling waren van deze alternatieve herstelprocessen. Deze handtekening noemden wij ons *BRCA1-deficiëntie profiel*.

Gebruikmakend van publieke databanken met genexpressie data van borstkanker toonden we aan dat ons *BRCA1-deficiëntie profiel* in staat was om preferentieel tumoren te identificeren, die zich ontwikkelen bij vrouwen die drager zijn van een mutatie in één van de BRCA genen. Ook kon deze handtekening, in vergelijking met twee commercieel gebruikte profielen, beter de overleving (ook wel prognose genoemd) voorspellen in hetzelfde patiëntencohort met publieke genexpressie data. Voor meerdere eiwitten aangetroffen in ons *BRCA1-deficiëntie profiel*, zoals PARP1, TOP1 en TOP2A, zijn geneesmiddelen beschikbaar die hun functie verstoren. Tumoren met een defect in het BRCA1 gen zouden hierbij baat kunnen hebben. Enkele andere geïdentificeerde eiwitten bleken betrokken bij het herstel van DNA op basis van HR (zoals bijvoorbeeld ATM, MDC1 en P53BP1). We toonden ook aan dat ons BRCA1-deficiëntie profiel tumoren kan selecteren met een bepaald type mutatie in het P53 gen. Dit genetische defect kan vaak voorkomen in tumoren van patiënten die drager zijn van een BRCA1 mutatie, maar komt ook wel voor bij sporadische borstkanker.

In **hoofdstuk 3** van dit proefschrift hebben we ons geconcentreerd op het vinden van eiwitmarkers die dienst kunnen doen bij de vroegtijdige identificatie en/of diagnose van borstkanker met een BRCA1 of gelijkaardig defect. Dergelijke vroege detectie eiwitmarkers dienen op een niet-invasieve manier te worden gemeten in bijvoorbeeld bloed of tepelvocht. Eiwitmarkers voor een vroegtijdige detectie van tumoren die zich ontwikkelen bij BRCA1 mutatie dragers kunnen complementair zijn aan mammografische screening. Om dergelijke markers te identificeren hebben we eiwitten gemeten die vrijkomen in het kweekmedium van borstkankercellen die in het lab worden gekweekt. We hebben een vergelijking gemaakt tussen eiwitten die worden afgegeven door cellen met een BRCA1 defect en cellen zonder dit defect. Op deze manier konden we een set van 215 eiwitten identificeren die kwantitatief in hoge mate worden afgegeven door de cellen met het BRCA1 defect. Met deze set van 215 eiwitten waren we in staat om met behulp van genexpressie data tumoren te herkennen die ontstaan zijn bij BRCA1 en BRCA2 mutatie dragers.

R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
R9
R10
R11
R12
R13
R14
R15
R16
R17
R18
R19
R20
R21
R22
R23
R24
R25
R26
R27
R28
R29
R30
R31
R32
R33
R34
R35
R36
R37
R38
R39

D

R1 Een verrassende bevinding in het onderzoek naar afgegeven eiwitten door cellen met een
R2 BRCA1 defect was de aanwezigheid van een hoog aantal eiwitten, dat zich normaliter in
R3 de celkern bevindt. Naast rechtstreekse afgifte via de celwand zelf, kunnen eiwitten ook
R4 op een alternatieve manier worden afgegeven, waarbij ze als het ware worden ingepakt in
R5 blaasjes (microvesikels) die ontstaan door uitstulpingen in de celwand. In een eiwitanalyse
R6 van deze microvesikels, geïsoleerd uit het celweekmedium, kwam naar voren dat een grote
R7 sub-set van onze 215 eiwitten (inclusief die uit de celkern) op deze alternatieve manier
R8 de cel verlaat. Verder zagen we interessant genoeg ook, dat veel van de 215 kandidaat
R9 eiwitmarkers voorheen beschreven waren in de wetenschappelijke literatuur vanwege een
R10 functie die gerelateerd is aan de werking van het BRCA1 eiwit. Deze eerdere beschrijving gaf
R11 dus extra ondersteuning aan de uitkomst van onze analyses. Van twee eiwitten (TOP1 en
R12 CDH3) hebben we ook de toegenomen eiwitexpressie in borsttumorweefsel van dragers van
R13 een BRCA1 of BRCA2 genmutatie aangetoond met behulp van immunohistochemie. Deze
R14 techniek kan op weefselcoupes met een kleuring nagaan of de relevante eiwitten aanwezig
R15 zijn, zoals in dit geval TOP1 of CDH3.

R16
R17 Het identificeren van eiwitmarkers die voorspellen of een therapie zal aanslaan is een
R18 uitdagend onderzoeksveld en biedt perspectief voor het ontwikkelen van *op tumortype*
R19 *gerichte* behandelingen, ook wel *therapie op maat* genoemd. Om beter te kunnen
R20 voorspellen of een behandeling aanslaat, zou een korte blootstelling van de tumor met het
R21 beoogde geneesmiddel een goede strategie kunnen zijn. Proteomics analyse toegepast in
R22 deze setting heeft de potentie om eiwitmarkers te vinden die alleen tot uiting komen na
R23 toediening van het geneesmiddel en die mogelijk iets te maken hebben met herstel van DNA
R24 schade of resistentie tegen dit middel. In **hoofdstuk 4** hebben we bovengenoemde strategie
R25 toegepast door tumoren met of zonder BRCA1 defect kort te behandelen met cisplatin, een
R26 geneesmiddel dat DNA schade veroorzaakt. We konden verschillende eiwitten identificeren
R27 met een regulatiepatroon dat geassocieerd bleek met deze behandeling. Eiwitten die
R28 verhoogd tot uiting kwamen (opregulatie) in BRCA1-deficiënte tumoren na behandeling
R29 met cisplatin hadden vooral een functie bij het onderhoud en de verdubbeling van DNA,
R30 die nodig is voor celdeling. Bij de tumoren zonder BRCA1 defect zagen we na behandeling
R31 juist meer eiwitten die te maken hadden met vetzuurmetabolisme. Verder konden we ook
R32 een set van 56 eiwitten identificeren die de vier verschillende experimentele condities
R33 konden onderscheiden (wel of niet behandeld en met of zonder BRCA1 defect). Onderhoud
R34 van DNA en veranderingen in metabolisme werden onlangs erkend als twee universele
R35 kenmerken van kanker. In deze studie lieten we zien dat deze twee universele kenmerken
R36 mogelijk gerelateerd zijn. Het bestaan van deze relatie werd ondersteund door een proef,
R37 waarbij één van de vetzuursynthesegenen werd uitgeschakeld in de cellen zonder BRCA1
R38 defect en niet gevoelig zijn voor cisplatin. De uitschakeling van dit vetzuursynthesegen
R39

zorgde ervoor, dat de cellen zonder BRCA1 deficiëntie gevoelig werden voor cisplatin. De uitkomst van dit experiment kan ook consequenties hebben voor andere behandelingen, aangezien het bekend is dat de geteste cellen tevens ongevoelig zijn tegen een hele reeks andere antikanker geneesmiddelen.

Biomarker-gerelateerd proteomics onderzoek heeft tot doel om kandidaat eiwitmarkers die ontdekt zijn in globale profilerings experimenten te valideren en te ontwikkelen naar een klinisch bruikbare test, om zo een bijdrage te leveren aan betere classificatie van kanker en gerichtere behandelingen. Om een dergelijke vertaling naar een klinische toepassing mogelijk te maken is het van belang, dat tijdens de ontdekkingsfase voldoende monsters worden gebruikt in de proteomics analyse. Dergelijke ontdekkingsexperimenten worden binnen ons lab uitgevoerd via gel-elektroforese en massaspectrometrie. Bij gel-elektroforese worden eiwitten gescheiden op grootte door deze vanwege hun elektrische lading te laten migreren door een gel waarover een elektrisch veld is aangebracht. De verschillende eiwitten van elk geanalyseerd monster worden op deze manier over de lengte van de gel uitgespreid in een gellaan. Voor ieder monster wordt deze gellaan in 5-10 stukjes gesneden die allemaal verder worden opgewerkt voor proteomics analyse. Dit resulteert uiteindelijk in enkele tientallen tot zelfs honderden analyses, wanneer 10 tot 20 monsters worden onderzocht op hun eiwitsamenstelling. Dergelijk experimenten genereren dus veel labwerk, omdat de gelstukjes allemaal apart aan een chemisch/enzymatisch protocol (ook wel het “gel-digestie” genoemd) moeten worden onderworpen. Om dit labwerk sneller door minder handwerk te laten gebeuren hebben we in **hoofdstuk 5** een verandering aangebracht in het “gel-digestie” protocol door de gel pas in bandjes te knippen in één van de laatste stappen. Dit snellere protocol werkte even goed en liet ons toe meer gelanalyses te doen, waarbij we alle voordelen van een gelanalyse konden behouden. Ook toonden we aan, dat dit protocol kan worden toegepast op tumorweefsel dat is opgeslagen in een paraffineblokje. Zo’n paraffineblokje is een veel gebruikte methode om tumoren jarenlang te bewaren. Deze weefsels vormen het uitgangsmateriaal voor veel onderzoek naar nog onbekende eigenschappen van tumoren, die belangrijk zouden kunnen zijn voor behandeling en prognose.

In **hoofdstuk 6** hebben we een methode beschreven voor de statistische analyse van kwantitatieve eiwitdata verkregen door massaspectrometrie. Met massaspectrometrie wordt de hoeveelheid eiwitten bepaald door het aantal gedetecteerde eiwitfragmenten, dat tot één bepaald eiwit behoort, op te tellen. Om met zekerheid te zeggen dat deze optellingen voor de vele duizenden eiwitten over meerdere monsters al dan niet significant verschillen in mate van voorkomen, hebben we speciaal voor dit soort data een statistische test ontwikkeld. In vergelijking met andere statistische tests kwam naar voren, dat onze test het best kon aangeven of verschillen in eiwithoeveelheid al dan niet significant waren. Onze

R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
R9
R10
R11
R12
R13
R14
R15
R16
R17
R18
R19
R20
R21
R22
R23
R24
R25
R26
R27
R28
R29
R30
R31
R32
R33
R34
R35
R36
R37
R38
R39

D

R1 statistische test bleef ook optimaal presteren, wanneer er meer of minder monsters (al dan
R2 niet gebalanceerd) met elkaar werden vergeleken. Momenteel onderzoeken we ook of onze
R3 test bruikbaar is bij andere technieken die het nodig maken om op een grootschalige manier
R4 biologische monsters te analyseren.

R5 De verbeteringen die wij hebben doorgevoerd in het hanteren van veel monsters en de
R6 analyse van heel veel data werden niet alleen gebruikt voor dit proefschrift, maar ook bij
R7 veel andere projecten. Vooral de statistische test wordt door meerdere groepen wereldwijd
R8 gebruikt.

R9
R10 Tot slot kunnen we zeggen dat proteomics en andere grootschalige analysetechnieken
R11 momenteel vele kandidaat eiwitmarkers genereren met potentiële toepassingen voor
R12 de diagnose van een specifieke vorm van kanker en voor *therapie op maat*. De grootste
R13 uitdaging is steeds om kandidaat eiwitmarkers te vertalen naar klinische toepassingen.
R14 De vlugge ontwikkeling van nieuwe proteomics technieken, samen met meer uitgebreide
R15 experimentele en klinische validatiestudies zullen van belang zijn om te verzekeren dat de
R16 kandidaat eiwitmarkers beschreven in dit proefschrift toepassing vinden binnen de kliniek
R17 om een betere zorg te verlenen aan borstkankerpatiënten.

R18
R19
R20
R21
R22
R23
R24
R25
R26
R27
R28
R29
R30
R31
R32
R33
R34
R35
R36
R37
R38
R39