
**NEDERLANDSE
SAMENVATTING**



Fanconi anemie (FA) is een zeldzaam genomisch instabiliteitssyndroom gekenmerkt door een verscheidenheid aan aangeboren afwijkingen, beenmergfalen en verhoogd risico op het krijgen van kanker. De meerderheid van de FA patiënten ontwikkelt al op jonge leeftijd beenmergfalen, wat een belangrijke doodsoorzaak is. Aangezien de uitkomsten van beenmergtransplantaties bij FA patiënten de laatste jaren enorm verbeterd zijn, is de grote kans op het krijgen van een solide tumor, en met name hoofd-en-hals kanker, het volgende levensbedreigende probleem. Cellen van FA patiënten laten een defect zien in het repareren van DNA schade geïnduceerd door chemische middelen die DNA interstrand crosslinks (ICL) veroorzaken. Een voorbeeld van zo'n middel is het veelgebruikte chemotherapeuticum cisplatine. Als gevolg van een kapot DNA reparatie mechanisme vertonen FA cellen meer genomische instabiliteit en dit kan leiden tot kanker. Het identificeren van alle FA eiwitten betrokken bij dit DNA reparatie mechanisme zal inzicht geven in hoe ICLs worden gerepareerd, en wellicht ook in het ontstaan van kanker. Daarnaast leidt het tot een beter begrip van de respons op chemotherapie aangezien FA cellen overgevoelig zijn voor sommige chemotherapeutische middelen, zoals cisplatine. Om deze redenen is een deel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift gericht geweest op het identificeren van FA eiwitten. Gezien FA patiënten specifiek een hoge kans hebben op het krijgen van een plaveiselcarcinoom in het hoofd-hals gebied (HHPCC), hebben we ook onderzocht of mutaties in FA genen voorkomen in HHPCC van niet-FA patiënten. Ten slotte hebben we bekeken of defecten in het FA reparatie mechanisme benut kunnen worden bij de behandeling van kanker.

In de eerste hoofdstukken van dit proefschrift (**Hoofdstuk 2-4**) beschrijven we de identificatie van twee genen (*FANCP/SLX4* en *FANCO/ERCC4/XPF*). Mutaties in deze genen kunnen FA veroorzaken. Mutaties in *FANCP/SLX4* werden gevonden in één Nederlandse en vier Duitse FA patiënten, terwijl mutaties in *FANCO/ERCC4/XPF* verantwoordelijk waren voor het krijgen van FA in een Duits en een Spaans individu. Momenteel zijn er 17 FA genen bekend en de eiwitten die worden gecodeerd door deze genen functioneren in het FA reparatie mechanisme om ICLs te verwijderen. Het *SLX4* eiwit speelt een belangrijke rol bij de coördinatie van verschillende structuur-specifieke endonucleases, zoals *XPF*, die in staat zijn het DNA te knippen als onderdeel van het reparatie proces. Behalve in DNA interstrand crosslink reparatie, functioneert *XPF* ook in een ander DNA reparatie mechanisme, dat betrokken is bij het herstellen van UV-geïnduceerde DNA schade. Mutaties in *FANCO/ERCC4/XPF* waren eerder al geassocieerd met twee andere syndromen: Xeroderma pigmentosum (XP) en *XPF-ERCC1* (XFE) progeroid syndroom. XP wordt gekenmerkt door gevoeligheid voor UV-licht (zonlicht) en daarmee gepaard een verhoogd risico op het krijgen van huidkanker, terwijl de enige patiënt beschreven met XFE progeroid syndroom zowel kenmerken van FA als XP heeft. Dus mutaties in één enkel gen worden nu geassocieerd met drie verschillende klinische

aandoeningen: XP, XFE progeroid syndroom en FA. Het type mutatie in *FANCC/ERCC4/XPF*, en daaruit volgend welk DNA reparatie mechanisme niet meer werkt, bepaalt welk syndroom de patiënt krijgt. Bij FA patiënten wordt hoofdzakelijk de reparatie van ICLs belemmerd, terwijl het herstel van UV-geïnduceerde DNA schade met name defect is bij XP patiënten. Wanneer de werking van beide mechanismen is aangedaan, zal dit resulteren in XFE progeroid syndroom.

In **Hoofdstuk 5** beschrijven we het voorkomen van pathogene mutaties in FA genen in hoofd-hals tumor cellijnen afkomstig van individuen zonder FA. Hoewel we aangetoond hebben dat een groot aantal (53%) van deze HHPCC cellijnen een typisch FA kenmerk heeft (ICL-geïnduceerde chromosomale breuken), zijn defecten in de bekende FA genen in deze cellijnen zeldzaam. In groepen van 17 en 39 onderzochte HHPCC cellijnen, vonden we één cellijn met mutaties in *FANCM* en in één met promotor hypermethylering van *FANCF*. Het inactiveren van FA genen door mutaties of promotor methylering zorgt ervoor dat DNA schade niet kan worden hersteld met als gevolg een verhoogde gevoeligheid voor chemische stoffen die ICLs veroorzaken en chromosomale instabiliteit (CIN). Dit laatste is een kenmerk van vele soorten kanker. CIN kan ook ontstaan door de ongelijke verdeling van chromosomen over de twee dochtercellen wanneer een cel deelt. Chromosoom segregatie wordt geregeld door verschillende processen, inclusief een proces dat bekend staat als “zuster-chromatidecohesie”. Een defect in dit proces wordt geassocieerd met verschillende ziektebeelden, gezamenlijk bekend als cohesinopathieën (bijvoorbeeld Roberts syndroom en Warsaw breakage syndroom). Aangezien cellen afkomstig van patiënten met Roberts syndroom of Warsaw breakage syndroom net als FA cellen ICL-geïnduceerde chromosomale breuken laten zien, hebben we ook bekeken of defecten in zuster-chromatidecohesie voorkomen in HHPCC cellijnen. Ernstige zuster-chromatidecohesie defecten werden waargenomen bij 29% van de onderzochte HHPCC cellijnen. Deze defecten konden in twee cellijnen verklaard worden door mutaties in *PDS5A* of *STAG2*. Dus inactivatie van FA genen of genen betrokken bij zuster-chromatidecohesie komt af en toe voor in HHPCC cellijnen, en daarmee geven we mogelijke verklaringen voor de waargenomen CIN in een deel van de hoofd-hals tumoren. Het screenen van tumoren met deze mutaties kan relevant zijn voor het voorspellen van de respons op het chemotherapeutische middel cisplatine, omdat FA deficiënte cellen overgevoelig zijn voor dit geneesmiddel. Echter in veel gevallen konden we geen bekend FA gen vinden dat de cellulaire fenotypes kon verklaren.

In **Hoofdstuk 6**, leveren we bewijs dat FA en zuster-chromatidecohesie defecten in anti-kanker therapieën kunnen worden benut. Eerdere studies toonden al aan dat *FANCD1/BRCA2*, *FANCN/PALB2*, *FANCO/RAD51C* of *FANCP/SLX4* deficiëntie resulteert in gevoeligheid voor remmers van het eiwit PARP. Dit zou kunnen worden gebruikt bij de behandeling van tumoren met mutaties in de corresponderende FA genen. We hebben bevestigd dat lymfoblasten afkomstig van FA-patiënten met

mutaties in *FANCD1/BRCA2* of *FANCN/PALB2* gevoelig zijn voor de remming van PARP. Daarnaast toonden we aan dat lymfoblasten afkomstig van FA-patiënten met mutaties in *FANCM* gevoelig zijn voor PARP-remmers. Echter, *SLX4*-deficiënte lymfoblasten waren niet bijzonder gevoelig voor remming van PARP, wat kan worden verklaard door de aanwezigheid van een verkorte versie van het *SLX4* eiwit in deze cellen. Verder lieten we zien dat afhankelijk van de mutatie in *FANCD1/BRCA2*, cellen meer of minder gevoelig zijn voor PARP-remming. Om te testen of cellen afkomstig van personen met een syndroom klinisch gerelateerd aan FA ook gevoelig zijn voor PARP-remmers, werden lymfoblasten van personen met een cohesinopathie getest. Cellen met mutaties in *DDX11*, de oorzaak voor Warsaw breakage syndroom, bleken ook gevoelig voor PARP-remming. Samenvattend, hebben we *FANCM* en *DDX11* als determinanten van PARP-remmer respons geïdentificeerd en dit kan de bruikbaarheid van deze middelen bij het behandelen van kanker verder uitbreiden.

PARP remmers zijn een voorbeeld van een mogelijk doelgerichte kanker therapie (een therapie die erop gericht is tumoren met bepaalde eigenschappen (zoals FA defecten) te behandelen). Om extra aanknopingspunten te vinden voor doelgerichte therapie bij zowel FA patiënten als patiënten met FA-deficiënte tumoren, hebben we een genoom-brede siRNA screen (zie **Hoofdstuk 7**) uitgevoerd. Hoewel er meer onderzoek nodig is, vonden we twee klassen van synthetische dodelijke interacties. De eerste klasse is tumor-specifiek (celviabiliteit wordt alleen of sterker verminderd in kankercellen vergeleken met gewone cellen) en onafhankelijk van FA status waardoor deze klasse een behandelingsstrategie kan verschaffen voor patiënten met of zonder FA. Deze tumor-specifieke klasse omvat remming van de vacuolaire ATPase, een proton pomp betrokken bij pH homeostase en de spindle assembly checkpoint, welke nodig is voor de juiste verdeling van chromosomen tijdens de celdeling. De tweede klasse is FA-specifiek (celviabiliteit wordt alleen of sterker verminderd in cellen met een FA defect) en is veelbelovend om verder te onderzoeken voor de kleine groep patiënten die een tumor met een defect in het FA reparatie mechanisme hebben. Deze klasse omvat de remming van verscheidene nucleoporins (eiwitten die deel uitmaken van een groot multi-subunit complex betrokken bij onder andere eiwittransport, genexpressie en DNA reparatie) en het proteasoom, dat een belangrijke rol speelt bij eiwitafbraak.

Samenvattend heeft het werk in dit proefschrift geleid tot de identificatie van twee FA genen (*FANCP/SLX4* en *FANCO/ERCC4/XPF*), het aantonen van het zelden voorkomen van FA defecten in HHPCC cellijnen van niet-FA individuen en de eerste stappen in het onderzoek of deze FA defecten in tumoren kunnen worden benut om nieuwe behandelingen tegen kanker te ontwikkelen.