

# Innovatief onderzoek naar eiwitten bij triple negatieve borstkanker

Het huidige kankeronderzoek wordt sterk gedomineerd door genetische analyse (genomics), maar mede dankzij geavanceerde massaspectroscopie komt er steeds meer ruimte voor de analyse van eiwitten (proteomics). Onderzoekers in Amsterdam en Utrecht werken samen om voor triple negatieve borstkanker eiwitbiomarkers te identificeren en te valideren. Zo'n eiwitprofiel moet informatie geven over het vermogen van de tumorcellen om dubbelstrengs DNA-breuken te repareren, dus over hun gevoeligheid voor chemotherapeutica en nieuwe middelen (zoals PARP1-remmers) die dit soort DNA-schade veroorzaken.

Dr. J.H. van Dierendonck, wetenschapsjournalist

Aanleiding voor het gesprek is de toekenning van een KWF-subsidie met als titel *Discovery and clinical validation of novel protein biomarkers for homologous recombination deficient breast cancer*. Dr. Connie Jimenez, oprichter en hoofd van het OncoProteomics Laboratory van de afdeling Medische Oncologie van het VU medisch centrum, Amsterdam, en initiatiefnemer van het Netherlands Proteomics Platform, fungeert als projectleider en werkt nauw samen met prof. dr. Jos Jonkers en diens collega dr. Sven Rottenberg van de afdeling Moleculaire Pathologie van het Antoni van Leeuwenhoek (AvL), Amsterdam, en met prof. dr. Paul van Diest, patholoog in het UMC Utrecht. "We vormen een krachtig

multidisciplinair *dreamteam* waarin we de analyse van expressie en functionaliteit van relevante eiwitten (proteomics)

"Jonkers en ik hebben elkaar jaren geleden op een congres ontmoet en besloten om mammatumoren die ont-

inmiddels geleid tot een serie publicaties, patenten en een dissertatie. We zagen dat *BRCA1*-gemuteerde muizen-tumoren de productie van enorm veel verschillende eiwitten verhoogden die op enigerlei betrokken zijn bij DNA-schadeherstel en herschikking van chromatine. Op basis van een bepaalde bioinformaticastrategie van functionele data-analyse selecteerden we 45 van deze herstel- en chromatine-eiwitten die bruikbaar bleken om humane *BRCA1*-gemuteerde borstkanker te identificeren. De aanwezigheid van eiwitten zegt vaak meer over de functionaliteit van cellulaire processen dan DNA- of mRNA-bepalingen. Bovendien is immunohistochemie prima uitvoerbaar op formalinegefixeerde weefsels en

daardoor zeer geschikt voor de klinische praktijk."

**"De eerste validatie van de immunohistochemische detectie van 'BRCAness' is veelbelovende en ik denk dat dit zeer bruikbaar is voor de dagelijkse pathologiepraktijk"**

combineren met muismodellen voor mammacarcinoom en met onderzoek aan weefsels van borstkankerpatiënten", vertelt Jimenez.

stonden in genetisch gemanipuleerde muizen met inactiverende mutaties in hun *BRCA-1*-gen te onderwerpen aan proteomics. Die samenwerking heeft

## Weefselmicroarray

Eén op de zes patiënten met invasieve borstkanker mist expressie van oestrogen-, progesteron- en epidermale groeifactor type2 (HER2)-receptoren en komt dus niet in aanmerking voor hormonale therapie, noch voor een anti-HER2-middel als trastuzumab. Wel zijn deze triple negatieve tumoren relatief gevoelig voor chemotherapie. Een deel van deze chemotherapiegevoelige patiënten heeft een gemuteerd *BRCA1*-gen. Een functioneel *BRCA1*-eiwit is essentieel voor het via homologe recombinatie (HR) repareren van dubbelstrengs DNA-breuken. Tumoren waarin dit mechanisme is uitgeschakeld, blijken hypergevoelig voor PARP-remmers en platinumbevattende chemotherapeutica.

Van Diest: "Een volgende stap was na te gaan of we deze therapiegevoelige patiënten er met behulp van immunohistochemie uit zouden kunnen pikken. In Utrecht hebben we de beschikking over een serie van 200 humane *BRCA1*-en -2-gemuteerde en sporadische tumoren op een zogeheten weefselmicroarray, waarbij je in één coupe alle tumorweefsels tegelijkertijd kunt onderwerpen aan immunohistochemie. We hebben hierop een serie van vijf verschillende eiwitten uit de genoemde serie van 45 getest waartegen goede antilichamen beschikbaar waren. Vier hiervan blijken in vergelijking met ongemuteerde tumoren sterk verhoogd tot expressie te komen op *BRCA1*-gemuteerde tumoren. De publicatie hierover is in voorbereiding en dit werk ligt mede ten grondslag aan dit KWF-project."

## Xenograftmodellen

Om HR-defecten te kunnen bestuderen in relatie tot gevoeligheid voor chemotherapie in triple negatieve borstkankers waarin *BRCA1* is uitgeschakeld (door mutaties of door epigenetische veranderingen, dat wil zeggen DNA-methy-



Van boven naar beneden:  
Paul van Diest, Connie Jimenez en  
Sven Rottenberg

ven met de DNA-crosslinker cisplatine, de alkylkerende stoffen melfalan en nimustine, en met de PARP-remmer olaparib. Rottenberg: “Tumoren zonder functioneel BRCA1 bleken zeer gevoelig – na een korte behandeling waren ze vaak al snel niet meer voelbaar. Maar ze verdwenen zelden helemaal, er bleven altijd wel resistente cellen over en die ongevoeligheid had vaak te maken met vernieuwde functionele HR, hetzij door herstellende mutaties, hetzij door epigenetische mechanismen.”

**Fosfoproteomics**

De veertig HR-deficiënte en HR-profiënte triple negatieve borstkankerenograftmodellen zijn in het kader van een eerder KWF-project van Jonkers al gekarakteriseerd wat betreft morfologie, (epi)genetica en de IC50 voor al die verschillende antikankermiddelen. Teneinde betrouwbare eiwitbiomarkers te identificeren voor een nieuwe HR-deficiëntietest zal de serie nu worden onderworpen aan de modernste proteomicstechnieken. Een nieuw element is dat men daarbij de aandacht richt op

de fosforyleringsgraad van de betrokken eiwitten, omdat dit een indicatie is voor de activiteit van relevante kinases, dus van de functionaliteit van de herstelprocessen.

Jimenez: “Naast proteomics kan fosfoproteomics een schat aan nieuwe inzichten opleveren, met nieuwe potentiële eiwitmarkers en therapeutische targets. In ons Proteomics Lab staat voor ruim anderhalfmiljoen euro aan infrastructuur. We beschikken over de nieuwste massaspectrometers waar-

mee we eiwitten grootschalig kunnen identificeren en kwantificeren in discovery-experimenten. Vervolgens kunnen we met zogeheten *Multiple Selected Reaction Monitoring* doelgericht tientallen specifieke eiwitten tegelijk bepalen zonder tussenkomst van antilichamen in grote aantallen patiëntenmonsters. Misschien dat dit soort technieken ooit nog wel eens klinische routine wordt in de pathologiepraktijk, maar voorlopig is ons einddoel een valide immuunhistochemische test gericht tegen een beperkt aantal eiwitten.”

lering) brachten de onderzoekers een ander modelsysteem in stelling: weefsels van veertig patiënten met dergelijke borsttumoren laat men onderhuids groeien in immuundeficiënte muizen, zogeheten xenograftmodellen. “Elk model heeft zijn voor- en nadelen, maar gecombineerd leveren ze de noodzakelijke synergie”, licht dierpatholoog en moleculair bioloog Rottenberg toe. “Met het genetische muismodel kun je heel gericht mutaties aanbrengen, maar uiteindelijk wil je ook weten wat er gebeurt in humane tumoren. Markers die uit deze modellen komen, kunnen we dan testen in weefselarray. Ook gaan we dit nog valideren op basis van tumorweefselmateriaal van een klinische studie, zodat we de voorspellende waarde ervan kunnen vaststellen.” Van Diest: “In Utrecht vergelijken we de morfologie van de subcutaan groeiende en doorgetransplanteerde xenografts met de oorspronkelijke tumorweefsels en we zien dat alle kenmerken behouden blijven.” Dat geldt overigens ook voor de genetische kenmerken.

Inmiddels zijn de xenograftmuizen in de ‘Mouse Cancer Clinic’ van het AvL (een van de modernste muizenfaciliteiten van Europa) onderworpen aan proe-

