



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeting TGF β signaling pathway in fibrosis and cancer

Karkampouna, S.

Citation

Karkampouna, S. (2016, January 28). *Targeting TGF β signaling pathway in fibrosis and cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/37560>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/37560>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/37560> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Karkampouna, Sofia

Title: Targeting TGF β signaling pathway in fibrosis and cancer

Issue Date: 2016-01-28

Samenvatting

Kanker en chronische fibrose zijn verwoestende ziekten met een hoog sterftecijfer en een beperkt aantal therapieën die tot genezing kunnen leiden. Beide ziekten beïnvloeden het functioneren van en/of beschadigen meerdere organen, waarbij het extracellulaire micromilieu een essentiële rol speelt. Gezien de toename van het aantal gevallen per jaar is het verkrijgen van een beter inzicht in de biologische drijvers van deze ziekten van fundamenteel belang om effectieve therapieën te kunnen ontwikkelen.

Tijdens de embryonale ontwikkeling en het volwassen leven van een organisme wordt homeostase gereguleerd via diverse signaaltransductie routes die op moleculair niveau processen als celgroei, differentiatie of apoptose aansturen. Dezelfde signalen en signaal routes zijn vaak betrokken bij ziekten en ziekteprogressie, of zelfs de directe oorzaak ervan. Omgevingsfactoren en genetische factoren kunnen namelijk de werking van signaleringsmoleculen negatief beïnvloeden via mutaties in het DNA of via epigenetische mechanismen.

Een van de signaalroutes die in vele organen een belangrijke regulerende functie heeft, is de TGF β / BMP route, betrokken bij onder andere homeostase, weefselfibrose en kanker. In dit proefschrift is de rol van de TGF β / BMP route bij deze processen nader onderzocht, en is tevens gekeken naar het therapeutisch potentieel van het remmen van specifieke componenten van de route, daarbij gebruik makend van drugs die momenteel gebruikt worden in de kliniek, of nog getest worden in klinische studies.

Drie verschillende klassen van inhibitoren zijn gebruikt: remmers van de kinase activiteit van een subklasse TGF β membraan receptoren (ALK4, 5 en 7); een antisense oligonucleotide dat ALK5 mRNA splicing remt; en een zogenaamde ALK1 ligand trap: een peptide waarin het extracellulaire domein van ALK1 gefuseerd is met het Fc domein van antilichamen, wat daardoor BMP9 en BMP10 kan wegvangen. Deze remmers zijn gebruikt in een *ex vivo* humaan fibrose model en in (*in vivo*) muismodellen voor acuut leverfalen/ leverregeneratie, Dupuytren fibrose, en prostaat en lever kanker.

Hoofdstuk 1 beschrijft de basis aspecten van de TGF β / SMAD signaleringsroute, de regulering ervan, de interactie met andere signaalroutes en de rol bij homeostase van de lever, prostaat en bindweefsel. Bovendien wordt het effect van TGF β en BMP deregulering geïntroduceerd in de context van een aantal daaraan gerelateerde processen en ziekten: lever regeneratie, Dupuytren fibrose en prostaatweefsel maligniteiten. Vooruitgang in de ontwikkeling van geneesmiddelen heeft onderzoekers voorzien van therapeutische strategieën met potentiële klinische toepassing. In dit hoofdstuk worden de eigenschappen van de verschillende klassen van medicijnen die de TGF β route beïnvloeden beschreven, en hun status in lopende of afgeronde klinische studies.

In hoofdstuk 2 wordt een overzicht gegeven van de huidige kennis over de TGF β signaleringsroute in relatie tot de rol van de route bij leverregeneratie. Verschillende aspecten worden behandeld, zoals de embryonale ontwikkeling, de moleculaire mechanismen betrokken bij de regeneratie van hepatocyten en ovaal cellen, de plasticiteit van leverceltypen, en geïnduceerde herprogrammering van hepatocyten als celtherapie voor menselijke leverziekten. Herhaalde weefselbeschadiging leidt tot onherstelbare celregeneratie en een verschuiving naar de vorming van littekenweefsel (fibrose). Het eindstadium van overmatige fibrose in de lever (cirrose) is tevens een risicofactor voor de ontwikkeling van hepatocellulair

carcinoom. Om de progressie van leverziekte te begrijpen is nader onderzoek nodig naar de mechanismen die de balans tussen normale cel vervanging en fibrose bepalen. Overmatig activeren van de TGF β route leidt tot apoptose van epitheel cellen (acuut leverfalen), epitheliale-mesenchymale transitie, levercirrose en uiteindelijk kanker. *In vivo* remming van TGF β zou daarom gunstige effecten op leverziekten kunnen hebben.

In hoofdstuk 3 onderzochten we in een muizenmodel voor leverregeneratie na acute verwonding de *in vivo* toepasbaarheid van LY364947, een kleine chemische remmer van de kinase activiteit van de TGF β type I receptor ALK5. Toediening van LY364947 aan muizen behandeld met het hepatotoxine koolstoftetrachloride (CCl₄), versterkte zowel proliferatie van levercellen als herstel van het normale lever enzym expressie patroon, wat duidt op verbeterde genezing in vergelijking met muizen die de ALK5 remmer niet ontvingen. Het mogelijke mechanisme van dit effect is de remming van het cytostatische effect van TGF β door onderdrukking van de celcyclus remmer p21, opregulatie van prolifererend nucleair antigeen (PCNA) en fosforylering van histon 3.

In hoofdstuk 4 en 5 richtten we ons op de beperkingen van de bestaande methoden in het fibrose onderzoek, om de effecten van TGF β remming te bestuderen (primaire fibroblast kweken). Hiervoor ontwikkelden we nieuwe *ex vivo* methodiek voor onderzoek naar fibrotisch menselijk bindweefsel van de palmaire fascia (Dupuytren fibrose, een primair door TGF β -aangestuurde ziekte). Deze *ex vivo* methode wordt geïntroduceerd in hoofdstuk 4, samen met mogelijke toepassingen, zoals biochemische en beeldvormingstechnieken voor het bestuderen van de patiënt-specifieke pathogenese en de respons op potentiële antifibrotische geneesmiddelen. In hoofdstuk 5 hebben we dit nieuwe *ex vivo* kweekstelsel gebruikt om het anti-fibrotische potentieel van TGF β inhibitoren te analyseren. Remming van de ALK5 functie m.b.v. het antisense oligonucleotide of de kleine chemisch kinase-remmer verminderde het aantal collageen producerende myofibroblasten en verlaagde de expressie van extracellulaire matrixeiwitten, wat wijst op een verbetering van fibrose *ex vivo*. Zulke preklinische studies benadrukken het belang van TGF β remming voor de behandeling van fibrose, als monotherapie of in combinatie met andere stoffen, zoals anti-inflammatoire middelen.

In hoofdstuk 6 is het effect onderzocht van de anti-angiogene verbinding ALK1Fc (ACE-041, Acceleron), een stof die zowel aangrijpt op de tumor microomgeving (matrix en vasculatuur) als op de tumorcellen zelf. Toediening van ALK1Fc had *in vivo* anti-angiogene en tumor onderdrukkende effecten in een muizenmodel voor primaire prostaatkanker (geïnduceerd door orthotope transplantatie van menselijke prostaatkankercellen).

ALK1Fc is, zoals hierboven vermeld, een peptide dat BMP9 en BMP10, de TGF β familieleden die binden aan de TGF β type I receptor ALK1, kan binden en neutraliseren; de stof wordt momenteel getest als tumor angiogenese inhibitor in klinische studies voor de behandeling van vaste tumoren.

ALK1Fc verminderde het volume van primaire prostaattumoren (gevormd door de agressieve prostaatkanker cellijn PC3-M-Pro4), mogelijk door verminderde tumorvasculatuur. *In vivo* toediening van ALK1Fc werkte anti-angiogeen door op endotheel cellen de binding van BMP9 aan ALK1 te remmen. Echter, gebruik van ALK1Fc duidde ook op een direct effect van BMP9 op tumorcellen; BMP9 veroorzaakte opregulatie van de NOTCH ligand JAGGED en de kanker stamcel marker aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1A1) en versterkte de proliferatie

van prostaat tumorcellen.

In hoofdstuk 7 worden de bevindingen van dit proefschrift die gepresenteerd zijn in de eerdere hoofdstukken besproken onder een gemeenschappelijke noemer; de remming van TGF β / BMP signaaloverdracht in humane ziekten. Bovendien wordt de invloed van TGF β remmende strategieën in fundamenteel en klinisch onderzoek besproken, ook in relatie tot de toekomstperspectieven. Moleculaire signaturen kenmerkend voor weefselschade lijken vaak op de expressie patronen in menselijke maligniteiten. Onze preliminaire data wijzen op een rol van de TGF β type III receptor CRIPTO in leverregeneratie en humane hepatocellulaire carcinoomen (Appendix I). Normaliter komt CRIPTO alleen tot expressie tijdens de embryonale ontwikkeling. We laten echter zien dat in de muizenlever reactivering van CRIPTO plaatsvindt na acute schade door toxine. Door direct aan TGF β te binden kan CRIPTO TGF β signalering via SMAD2/ 3 verminderen; dit zou het cytostatische functie van TGF β kunnen verminderen en celoverlevings signalen kunnen activeren. Daardoor zou CRIPTO een mediator van het tumor stimulerende effect van TGF β kunnen zijn. De verhoogde eiwitniveaus van CRIPTO gevonden in biopten van menselijk hepatocellulair carcinoom duiden bovendien op een mogelijke kanker-bevorderende rol van CRIPTO in de lever, en geven aan dat CRIPTO gebruikt zou kunnen worden als een potentiële diagnostische biomarker voor humaan hepatocellulaire carcinoom.

Samengevat kan gezegd worden dat na de ontdekking van TGF β zeer veel studies hebben bijgedragen aan het tot stand komen van een begrijpelijk overzicht van al de moleculaire eigenschappen van de eiwit componenten van de route, en de biologische processen waarbij TGF β betrokken is. Vanwege het ziekte stimulerende effect van gedereguleerde TGF β / BMP signaaloverdracht is het belangrijkste aspect van het huidige onderzoek de therapeutische interventie in de signalering, op een klinisch relevante wijze. Op basis van onze waarnemingen kan remming van TGF β signalering veelbelovende effecten hebben bij vele ziekten en heeft het tevens additieve gunstige effecten in combinatie met andere geneesmiddelen, bijvoorbeeld - afhankelijk van de ziekte - in combinatie met chemotherapie, of anti-inflammatoire en immune modulerende middelen.

Echter, remming van TGF β signalering kan niet altijd toegepast worden, voornamelijk vanwege de homeostatische functie van TGF β in vele organen. Succesvolle modulatie van TGF β signalering vereist daarom zorgvuldige patiënt stratificatie en ziektekaracterisering met behulp van prognostische middelen zoals biomarkers en analyse van de patiënt-specifieke genetische variatie. De huidige en de toekomstige ontwikkelingen in drug toediening zullen hopelijk leiden tot verbetering van de weefsel-specifieke of celttype-specifieke targeting van de geneesmiddelen die op de TGF β route aangrijpen, samen met een precieze dosering en timing en een gepersonaliseerd behandelingschema.

We thank Dr. Hans van Dam for the Dutch translation of the Summary.