



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Novel candidate metastasis genes as putative drug targets for breast cancer

Roosmalen, W.P.E. van

Citation

Roosmalen, W. P. E. van. (2012, December 12). *Novel candidate metastasis genes as putative drug targets for breast cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20271>

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/1887/20271>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20271> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Roosmalen, Wies van

Title: Novel candidate metastasis genes as putative drug targets for breast cancer

Date: 2012-12-12

Nederlandse samenvatting

Borstkanker is de meest voorkomende vorm van kanker bij vrouwen. In Nederland worden ieder jaar meer dan 13.000 nieuwe gevallen gerapporteerd. Onderzoek in de afgelopen decennia heeft geresulteerd in verbeterde detectie in het vroege stadium van de ziekte en verbeterde behandelmethoden. Echter, 30% van de patiënten vertoont een terugval waarbij de ziekte terug keert. Wanneer de tumorgroei beperkt is tot de primaire plaats, is de behandeling relatief eenvoudig te realiseren door het chirurgisch verwijderen van de tumor en lokale bestraling. Het belangrijkste probleem van kanker is de vorming van uitzaaiingen, ook wel metastasen genoemd. Deze metastasen zijn vaak chemo-resistent en verspreiden zich door het hele lichaam, waardoor de behandeling gecompliceerd is. Metastasen zijn dan ook de oorzaak van de hoge mortaliteit van kanker. Ondanks uitvoerig onderzoek om de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het metastaseren van borstkanker te ontrafelen, overlijden in Nederland per jaar nog altijd 3.500 vrouwen aan de gevolgen van deze ziekte. Het verbeteren van onze kennis over metastasering blijft noodzakelijk voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën. Het doel van het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift is het identificeren van nieuwe genen die betrokken zijn bij metastasering. Deze genen dienen mogelijk als nieuwe aangrijpingspunten voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor de behandeling van borstkanker of dienen als biomarker voor het voorspellen van het ziekteverloop. De focus ligt op kandidaat genen die betrokken zijn bij de regulatie van tumor cel migratie.

Cel migratie is essentieel in kankerprogressie en is een complex proces met meerdere plaats en tijd gebonden geregelde en goed gecoördineerde mechanismen. Om (spontane) cel migratie te bestuderen in de context van verschillende externe signalen (zoals groeifactoren) of intrinsieke cel signalering zijn reeds een aantal verschillende instrumenten en methoden ontwikkeld. Om de belangrijkste signaalroutes en spelers betrokken bij de regulatie van (tumor) cel migratie te ontrafelen, is het systematisch in kaart brengen van de spelers en routes vereist. Hiervoor ontwikkelden wij een cel migratie assay gebaseerd op automatische 'high throughput' microscopie en deze is beschreven in **hoofdstuk 2**. Deze benadering maakt onderzoek van honderden genen mogelijk, bijv. genen die coderen voor verschillende kinasen en fosfatasen, maar kan ook gebruikt worden voor het screenen van geneesmiddel bibliotheken. Bovendien hebben wij een automatische analyse pijplijn gebouwd bestaande uit a) automatische data-acquisitie (video) en b) automatische analyse van de opgenomen video's van de migrerende cellen. In dit hoofdstuk zijn de verschillende facetten van deze aanpak beschreven. Aangezien

cel migratie een essentieel onderdeel van metastasering is, zijn twee voorbeelden van experimenten uitgevoerd met zeer beweeglijke (metastatische) kankercellen.

Het gebruik en ontwikkelen van diermodellen om nieuwe behandelingen voor borstkanker te evalueren en om onze kennis over metastasering te verbreden is noodzakelijk. In **hoofdstuk 3** wordt een geoptimaliseerd muismodel beschreven. Hier laten wij zien dat verhoogde expressie van de EGF receptor (EGFR) in de rat MTLn3 borstkanker cellijn essentieel is voor een efficiënte metastasering naar de longen in een immunodeficiënt Rag2^{-/-}γc^{-/-} muismodel. Bovendien laten wij zien dat dit muismodel ook geschikt is voor orthotope transplantatie van de 4T1 muis borstkanker cellijn, een cellijn die veelvuldig wordt gebruikt in onze onderzoeksgroep. Dit verbeterde *in vivo* model stelt ons in staat om tumorcel autonome mechanismen die ten grondslag liggen aan longmetastase vorming te bestuderen. Dit model kan worden gebruikt voor medicijn-target validatie en ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen de uitzaaiing van borstkanker.

Hoewel de rol van enkele matrix adhesie complex geassocieerde eiwitten in tumor cel migratie en invasie goed is onderzocht, ontbreekt een systematisch aanpak voor het bepalen van de functionele rol van individuele signalering en cel adhesie componenten in de context van tumor cel migratie en metastasering. In **hoofdstuk 4** beschrijven wij een geautomatiseerde multi-parametrische en kwantitatieve methode op basis van microscopie voor het bestuderen van cel migratie in 'high throughput'. Hiervoor is de 'phagokinetic track assay' met zeer beweeglijke H1299 adenocarcinoom cellen gebruikt. De rol van 1429 kinase signalering en celadhesie componenten is onderzocht door middel van RNA-interferentie techniek. Dertig belangrijke genen werden gevalideerd door 'live-cell imaging' van tumor cel migratie dat geassocieerd werd met het effect op matrix adhesie complex dynamiek. Voor acht genen werd een significante associatie met metastase vrije overleving bij borstkanker patiënten waargenomen, waar onder SHC1, SRPK1, NEK2, ITGB3BP en MAP3K8. Ook werd een hoge SRFS proteïne kinase 1 (SRPK1) eiwitexpressie op borstkanker weefsel micro-arrays geassocieerd met een slechte ziekte uitkomst van patiënten. SRPK1 expressie is het hoogst in basaal-achtige borstkanker cellijnen en vermindering van SRPK1 expressie resulteerde in verminderde borstkanker cel motiliteit en matrix adhesie complex dynamiek. Tot slot, in een *in vivo* borstkanker muismodel had een stabiele knockdown van SRPK1 in 4T1 basale-achtig borstkanker cellen geen invloed op de primaire tumorgroei, maar resulteerde in bijna volledige reductie van longmetastasen vorming. Deze studie heeft geresulteerd in een uitgebreide bron van informatie over de moleculaire factoren van tumor cel migratie

met een klinisch relevante rol in borstkanker progressie.

Voor tumorcellen die aan de primaire tumor ontsnappen om door te dringen in het omliggende weefsel en bloedvaten, is de activering van een epitheliale naar mesenchymale transitie (EMT) belangrijk voor het verkrijgen van invasief gedrag. Dit genetische programma wordt gekenmerkt door het verlies van de expressie van epitheliale markers zoals E-cadherine en verhoging van de expressie van mesenchymale markers, bijvoorbeeld N-cadherine en vimentine. In **hoofdstuk 5** beschrijven wij dat de transcriptiefactor FOS-gerelateerde antigen 1 (Fra-1) verhoogd tot expressie komt in mesenchymaal-achtige in vergelijking met epitheel-achtige borstkanker cellijnen. Maar direct bewijs voor een rol van Fra-1-gemedieerde EMT samen met metastasevorming ontbrak tot nu toe. In deze studie hebben wij aangetoond dat ectopische expressie van Fra-1 voldoende is om een volledig EMT genetisch programma te induceren in de lumbale borstkanker cellijn MCF7. Dit resulteerde tot verlies van cel-cel contacten en een verhoogde cel migratie met versnelde matrix adhesie complex dynamiek. Daarnaast hebben wij laten zien dat Fra-1 expressie leidt tot tumorvorming en metastasevorming in een *in vivo* borstkanker muismodel. Genexpressie analyse gevolgd door onafhankelijke hiërarchische clustering toonde aan dat de lumbale MCF7 cellijn na introductie van Fra-1 expressie zich gaat gedragen als een basaal B-achtige borstkanker cellijn. Tot slot hebben wij laten zien dat het verlagen van Fra-1 expressie in basaal B-celijnen het metastatische potentieel verlaagd. Samengevat wijzen deze resultaten op een dominante rol voor Fra-1 in borstkanker progressie en metastasering en dit suggereert dat Fra-1-gebaseerde signalering een goed aangrijpingspunt is voor de ontwikkeling van borstkanker therapieën.

Gerichte cel migratie vereist de coördinatie van de cel-matrix adhesie en cel-cel signalering en dit is van fundamenteel belang voor het ontstaan van metastasen. In **hoofdstuk 6** laten wij zien dat het matrix adhesie complex adaptor eiwit paxilline een cruciale rol speelt in de regulatie van borstkanker metastasering. Cellen die door shRNA-interferentie verminderde paxilline expressie hebben vertoonden een meer verspreid en minder gepolariseerd fenotype wat resulteerde in verminderde 2D cel migratie. Bovendien lieten knockdown cellen geen collectieve invasie in een 3D collageen omgeving zien in vergelijking met controle cellen. Depletie van paxilline leidde tot een bijna volledige remming van efficiënte kolonisatie van de longen in een 4T1 borstkanker muismodel. Genoom-brede expressie profilering liet zien dat expressie van Rac aanzienlijk werd gereduceerd, terwijl expressie van Cdc42 werd verhoogd in cellen zonder paxillin, hetgeen werd bevestigd door Western blotting.

Hoewel expressie van RhoA niet beïnvloed werd, bleek er een vermindering van de contractiele kracht, door een lagere RhoA/ROCK signalering-afhankelijke myosine II-activiteit waargenomen. Wij stellen daarom voor dat mate van paxilline expressie de niveaus en activiteit van Rho GTPases beïnvloedt en daarmee bijdraagt aan de wijze van celbeweeglijkheid en metastase vorming.

Samengevat heeft het onderzoek beschreven in dit proefschrift geresulteerd in de identificatie van een aantal nieuwe genen die betrokken zijn bij tumor cel migratie en metastasering, in het bijzonder SRPK1. Daarnaast is Fra-1 beschreven als een dominante factor in borstkanker progressie doormiddel van de inductie van EMT. Dit suggereert dat de door Fra-1 geactiveerde signaalroute een geldig aangrijpingspunt is voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën ter behandeling van borstkanker. Als laatste is de rol van paxilline in borstkanker progressie bestudeerd. Er is aangetoond dat paxilline gerichte tumor cel migratie controleert, mogelijk door het moduleren van Rac1-gemedieerde signalering. Verder onderzoek is noodzakelijk om de onderliggende moleculaire mechanismes van SRPK1-, Fra-1- en paxilline-gemedieerde metastasering in meer detail te ontrafelen. Dit leidt uiteindelijk tot het begrijpen van de cruciale signaalroutes die borstkanker progressie controleren en biedt perspectief voor therapeutische interventie.

List of abbreviations

2D	two-dimensional
3D	three-dimensional
AP-1	activation protein 1
BC	breast cancer
BRCA	breast cancer susceptibility gene
CCL5	chemokine ligand 5
CSC	cancer stem cell
CTC	circulating tumor cell
DCIS	ductal carcinoma in situ
DIC	differential interference contrast
DNA	deoxyribonucleic acid
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor, ErbB1
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
EndMT	endothelial-to-mesenchymal transition
ER	estrogen receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FA	focal adhesion
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
FDR	false discovery rate
FISH	fluorescence in situ hybridization
FLI	fluorescence imaging
FOSL1	FOS-related antigen 1, Fra-1
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GAP	GTPase activating protein
GEF	guanine-nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GO	gene ontology
GRB2	growth factor receptor bound protein 2
HCS	high content screening
H&E	hematoxylin and eosin

HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HGF	hepatocyte growth factor
HR	hazard ratio
HRP	horseradish peroxidase
IHC	immuno histo chemistry
IKBKE	inhibitor of NFkB kinase subunit epsilon
ILK	integrin linked kinase
KM	Kaplan-Meier
LCIS	lobular carcinoma in situ
LCK	lymphocytespecific protein tyrosine kinase
LD	leucine-rich domain
LNN	lymph node negative
MAP2K2	mitogen-activated protein kinase kinase 2, MEK2
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MET	mesenchymal-to-epithelial transition
MFS	metastasis free survival
MLCK	myosin light chain kinase
MMP	matrix metalloproteinase
NK	natural killer
PBS	phosphate-buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PKC	protein kinase C
PKL	paxillin kinase linker
PKT	phagokinetic track assay
pMLC	phosphorylated myosin light chain
PR	progesterone receptor
PXN	paxillin
RNA	ribonucleic acid
ROCK	rho kinase
RT QPCR	real time quantitative polymerase chain reaction
SHC1	src homology 2 domain containing transforming protein 1
shRNA	short hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid
snRNP	small nuclear ribonucleoproteins
SRB	sulforhodamine B

SRC	src kinase
SRPK1	SRSF protein kinase 1
TAM	tumor-associated macrophage
TGFbeta	transforming growth factor beta
TIRF	total internal reflection fluorescence
TMA	tissue micro array
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZEB	zinc finger E-box binding homeobox
ZO-1	zona occludens 1

List of publications

van Roosmalen W*, Le Dévédec SE*, Zovko S, de Bont H, van de Water B. Functional screening with a live cell imaging based random cell migration assay. *Methods in Molecular Biology*, 2011;769:435-48

Le Dévédec SE, **van Roosmalen W**, Pont C, Lalai R, de Bont H, van de Water B. Two-photon intravital multicolour imaging to study metastatic behaviour of cancer cells in vivo. *Methods in Molecular Biology*, 2011;769:331-49

Le Dévédec SE, **van Roosmalen W**, Maria N, Grimbergen M, Pont C, Lalai R, van de Water B. An improved model to study tumor cell autonomous metastasis programs using MTLn3 cells and the Rag2(-/-) γ c (-/-) mouse. *Clinical and Experimental Metastasis*, 2009;26(7):673-84

van Rheenen J, Song X, **van Roosmalen W**, Cammer M, Chen X, Desmarais V, Yip SC, Backer JM, Eddy RJ, Condeelis JS. EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *Journal of Cell Biology*, 2007;179(6):1247-59

van Roosmalen W, Le Dévédec SE, Golani O, Smid M, Timmermans M, Zi D, de Graauw M, Jacobse B, Lalai R, Naffar-Abu-Amara S, Martens JWM, Foekens JA, Geiger B, van de Water B. An imaging-based RNA-interference migration screen identifies the splicing related SRSF Protein Kinase 1 (SRPK1) as a clinical relevant breast cancer metastasis promoter. *Submitted*

van Roosmalen W*, Le Dévédec SE*, Isogai T, Smid M, Pont C, Lalai R, de Craene B, Berx G, Rogkoti VM, de Graauw M, Meerman J, Martens JWM, Foekens JA, van de Water B. FOS-Related Antigen 1 (FRA-1) switches breast cancer cells from a luminal to a basal-like subtype with spontaneous metastasis behavior. *Submitted*

Le Dévédec SE, Ma Y, Verkoeijen S, **van Roosmalen W**, van Miltenburg M, Lalai R, van de Water B. Serine 178 of the scaffold protein paxillin is essential for cancer cell migration and spontaneous metastasis formation through regulating EGFR expression. *Submitted*

Le Dévédec SE*, **van Roosmalen W***, Visser H, Truong H, Lalai R, Pont C, de Bont H, van de Water B. The focal adhesion-associated signaling adaptor paxillin is required for breast cancer metastasis by regulating directed cell migration. *Manuscript in preparation*

Le Dévédec SE, Zovko S, Jacobse B, Fokkelman M, Farla P, Yan K, Zi D, **van Roosmalen W**, Smid M, Martens JWM, Foekens JA, Verbeek F, van de Water B. Kinome wide screening for regulators of focal adhesions dynamics identifies PFKFB2 as a novel determinant of breast cancer progression. *Manuscript in preparation*

Curriculum vitae (Nederlands)

Wies van Roosmalen is geboren op 10 april 1984 in Uden. Na het behalen van het VWO diploma is zij in 2002 Bio-Farmaceutische Wetenschappen gaan studeren aan de Universiteit Leiden. In 2007 heeft zij haar master diploma behaald. Als onderdeel van het master programma heeft zij stage gelopen bij de vakgroep Toxicologie (LACDR, Universiteit Leiden) onder begeleiding van dr. Martine van Miltenburg en prof. dr. Bob van de Water. Het doel was om methoden te ontwikkelen voor het bestuderen van de rol van Focal Adhesion Kinase in borstkanker progressie. Daarnaast heeft zij stage gelopen bij de vakgroep Anatomie en Structurele Biologie (AECOM, New York) onder begeleiding van dr. Jacco van Rheenen en prof. dr. John Condeelis. Het doel van dit project was het bestuderen van de rol van PIP2 hydrolyse in het activateren van cofiline in metastaserende borstkanker cellen.

In 2008 is zij teruggekeerd bij de vakgroep Toxicologie (LACDR, Universiteit Leiden) als promovendus onder begeleiding van prof. dr. Bob van de Water. Het doel van haar project, beschreven in dit proefschrift, was het identificeren van nieuwe kandidaat genen betrokken bij metastasering. Deze genen kunnen dienen als aangrijppunten voor het ontwikkelen van nieuwe medicijnen voor de behandeling van borstkanker en/of kunnen dienen als biomarkers voor het voorspellen van het ziekteverloop. Als onderdeel van haar project is zij als gastwetenschapper werkzaam geweest in de groep van prof. dr. Benjamin Geiger (Weizmann Institute of Science, Israël) om samen te werken aan een 'high-throughput' tumor celmigratie screen.

Sinds oktober 2012 is zij werkzaam als postdoctoraal onderzoeker in de vakgroep Moleculaire Nanofabricatie (MESA+, Universiteit Twente) onder begeleiding van dr. Pascal Jonkheijm. Het doel van haar project is het combineren van supramoleculaire chemie met celbiologie om endotheliale celmigratie te manipuleren om zo vasculaire stents te verbeteren.

Curriculum vitae (English)

Wies van Roosmalen was born 10th of April 1984 in Uden, the Netherlands. After completing her pre-University education, she started her study Bio-Pharmaceutical Sciences at Leiden University in 2002 and obtained her Master degree in 2007. As part of her Master program, she did an internship at the division of Toxicology (LACDR, Leiden University) under supervision of dr. Martine van Miltenburg and prof. dr. Bob van de Water, aiming to develop methodologies to study the role of Focal Adhesion Kinase in breast cancer progression. In addition, she did an internship at the Department of Anatomy and Structural Biology (AECOM, New York) under supervision of dr. Jacco van Rheenen and prof. dr. John Condeelis. The aim of this project was to study the role of PIP2 hydrolysis in activation of cofilin in metastatic breast cancer cells.

In 2008, she rejoined the division of Toxicology (LACDR, Leiden University) as a PhD student under supervision of prof. dr. Bob van de Water. The aim of her project, described in this thesis, was to identify novel candidate metastasis genes that could serve as putative drug targets for breast cancer treatment and/or serve as biomarkers that predict poor disease outcome. As part of her project, she worked in the group of prof. dr. Benjamin Geiger (Weizmann Institute of Science, Israel) as a visiting scientist to collaborate on a high-throughput tumor cell migration screen.

Since October 2012, she is working as a postdoctoral researcher at the department of Molecular Nanofabrication (MESA+, University of Twente) under supervision of dr. Pascal Jonkheijm. The aim of her project is to combine supramolecular chemistry with cell biology to manipulate endothelial cell migration to improve vascular stents.

