



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Focal adhesion kinase signaling in metastasis and breast cancer treatment

Nimwegen, M.J. van

Citation

Nimwegen, M. J. van. (2007, March 21). *Focal adhesion kinase signaling in metastasis and breast cancer treatment*. Division of Toxicology, Leiden/Amsterdam Centre for Drug Research, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/11415>

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/1887/11415>

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

9

Nederlandse Samenvatting

1. BORSTKANKER IN NEDERLAND.

In Nederland wordt jaarlijks bij ongeveer 12.000 vrouwen en 70 mannen borstkanker gediagnostiseerd. Borstkanker is hiermee, goedaardige huidkanker niet meegerekend, de meest voorkomende kanker bij vrouwen in Nederland. In ons land heeft iedere vrouw een kans van 1 op 9 om gedurende haar leven geconfronteerd te worden met borstkanker. In bijna alle ontwikkelde landen vindt bevolkingsonderzoek naar borstkanker plaats; hierbij worden alle vrouwen vanaf 40 of 50 jaar iedere 1 tot 2 jaar gescand op borstkanker met behulp van mammografie. Dit heeft geresulteerd in een steeds vroegere diagnostisering. Ondanks de vervroegde diagnose en verbeterde therapieën daalt het sterftcijfer door borstkanker nauwelijks (in het jaar 2000 stierven 3425 vrouwen aan borstkanker; in het jaar 2005 waren dat er 3301).

2. HET ONTSTAAN EN UITZAAIEN VAN BORSTKANKER.

Borstkanker ontstaat doordat (melk)kliercellen in de borst ongecontroleerd delen. Wanneer dit delingsproces (ook wel groei of proliferatie) niet stopt, ontstaat een tumor. In tegenstelling tot normale cellen, negeren kankercellen signalen die de celdeling stopzetten. Deze verstoorde levenscyclus van een kankercel wordt veroorzaakt door 1 of meerdere mutaties (veranderingen) in het genetische materiaal van de cel, het DNA. Deze mutaties kunnen erfelijk zijn, maar ook veroorzaakt worden door externe stimuli zoals UV straling of chemische stoffen. Normaal gesproken kunnen de mutaties gerepareerd worden door de cel, maar wanneer dit niet lukt zal dit reden zijn voor de cel om zelfmoord, ook wel apoptose, te plegen. Wanneer deze cellen dat echter niet doen, kunnen ze ongecontroleerd doorgroeien en zo tumoren vormen.

Bij borstkanker is de primaire tumor (de tumor in de borst) nooit fataal. Op een gegeven moment is deze primaire tumor echter zo groot gegroeid dat de cellen in de kern van de tumor zo ver van de bloedvaten af liggen dat ze niet genoeg voedingsstoffen meer kunnen opnemen. De tumorcellen kunnen nu stoffen gaan uitscheiden die de aanleg van nieuwe bloedvaten, ook wel angiogenese, stimuleert. Niet alleen hebben alle tumorcellen nu toegang tot voedingsstoffen waardoor de tumor verder kan groeien, maar deze bloedvaten kunnen ook een vervoersmiddel voor de tumorcellen zijn om andere delen van het lichaam te bereiken. Op deze nieuwe plekken kunnen ze weer uitgroeien tot een secundaire tumor, ook wel metastase (uitzaaiing). Het proces om op een andere plek in het lichaam een secundaire tumor te vormen wordt metastaseren (uitzaaien) genoemd. Een tumorcel moet dan eerst los zien te komen van zijn burens en van de matrix (omgeving) waaraan hij gehecht is. Vervolgens moet hij zich richting het bloedvat begeven. Dit proces noemen we migratie. Eenmaal aangekomen bij het bloedvat moet hij daar binnen zien te komen (invaseren) en zien te overleven in het bloed. Op de plaats van

bestemming, voor borstkankercellen zijn dit vaak de longen, moet de tumorcel zich hechten aan het bloedvat om vervolgens uit het bloedvat, de longen in te kruipen. Eenmaal in de longen zal de tumorcel zich weer gaan delen om zo een secundaire tumor (metastase) te vormen. Naast bloedvaten kunnen tumorcellen ook metastaseren via de lymfevaten.

Om een metastase te vormen moet een tumorcel dus verschillende processen doorlopen: prolifereren, migreren, invaseren, extravaseren en weer prolifereren. Bij deze processen zijn verschillende signaaltransductie-routes in de cel betrokken. Tumorcellen brengen verschillende eiwitten die betrokken zijn in deze signaaltransductie-routes verhoogd tot expressie. Eén van de eiwitten die kankercellen vaak verhoogd tot expressie brengen is focal adhesie kinase (FAK).

3. PROBLEMEN BIJ DE BEHANDELING VAN (UITGEZAAIDE) BORSTKANKER.

De behandeling van borstkanker hangt af van het stadium waarin de ziekte zich bevindt. Behandeling van de primaire tumor is relatief makkelijk: de gehele tumor kan, eventueel samen met de dichtstbijzijnde lymfeklieren, operatief verwijderd worden. Meestal wordt na de operatie de borst bestraald om de eventueel achtergebleven tumorcellen te doden. Wanneer een verhoogd risico op uitzaaiingen is vastgesteld kan besloten worden tot chemotherapie.

De uitzaaiingen kunnen zich door het hele lichaam bevinden en zijn vaak nog te klein om te detecteren. Operatieve verwijdering is dus geen optie; het hele lichaam moet behandeld worden om de tumorcellen te doden of te laten stoppen met groeien. Dit gebeurt bijvoorbeeld door middel van chemotherapie of bestraling. Probleem is echter dat kankercellen vaak resistent zijn tegen deze anti-kanker geneesmiddelen. Bij het behandelen van tumorcellen met chemotherapie en bestraling speelt apoptose (zelfmoord) van de tumorcellen een grote rol. Apoptose is een actieve vorm van celdood waarbij verschillende signaaltransductie-routes in een cel ervoor zorgen dat die cel op een georganiseerde wijze doodgaat. Aan het eind van deze routes staan de caspases: dit zijn eiwitten die wanneer ze geactiveerd worden andere eiwitten knippen zodat deze, en daarmee de cel, hun functionaliteit verliezen. Sommige tumorcellen bevatten veel eiwitten die overlevingssignalen aan de cel geven: deze 'pro-survival' eiwitten kunnen verantwoordelijk zijn voor de resistentie tegen anti-kanker geneesmiddelen. Het eerder genoemde eiwit FAK is zo'n survival-eiwit wat vaak verhoogd tot expressie komt.

In dit proefschrift is de rol van FAK onderzocht bij het ontstaan van metastasen en bij de behandeling van primaire en uitgezaaide borstkanker met doxorubicine, een veel gebruikt chemotherapeutikum.

4. FOCAL ADHESION KINASE (FAK) EN BORSTKANKER.

Wanneer een cel bindt aan de matrix (zijn omgeving, vergelijkbaar met de specie tussen stenen), wordt het eiwit FAK geactiveerd. Dit betekent dat FAK nu andere eiwitten kan modifieren door een specifiek bouwsteen van een eiwit, het zogenaamde aminozuur tyrosine, te fosforyleren. Fosforylering van een eiwit resulteert in een toe- of afname in de activiteit van dat eiwit en daarmee in de activatie of inactivatie van een signaaltransductieroute. Als gevolg van de activatie van FAK hopen verschillende eiwitten zich op bij de plek waar de cel gehecht is aan de matrix. Deze verzameling van eiwitten worden 'focal adhesions' genoemd. Door de hoeveelheid van het eiwit FAK in patiënt-materiaal te meten is vastgesteld dat sommigen tumorcellen veel meer FAK bevatten dan 'normale' cellen. Belangrijker, veel studies laten zien dat FAK verhoogd tot expressie komt in de uitzaaiingen vergeleken met de primaire tumoren. Dit kan betekenen dat FAK een rol speelt bij het proces van metastaseren.

Naast het bestuderen van patiënt-materiaal blijkt uit in vitro onderzoek met behulp van kankercellijnen dat cellen met veel FAK minder makkelijk te doden zijn met chemotherapeutica dan cellen met meer FAK. FAK lijkt dus betrokken te zijn bij zowel het metastaseren van kankercellen als het ongevoelig zijn van kankercellen voor de huidige therapieën. Hierdoor zou FAK een belangrijk target kunnen zijn bij de ontwikkeling van nieuwe anti-kanker geneesmiddelen.

5. BEVINDINGEN IN DIT PROEFSCHRIFT.

In dit proefschrift is getracht de rol van FAK te ontrafelen in het metastaseren van borstkanker cellen en in de resistentie van deze borstkankercellen tegen het chemotherapeuticum doxorubicine. Als model voor borstkanker worden MTLn3 cellen gebruikt. Deze cellijn is oorspronkelijk geïsoleerd uit een borsttumor van een rat. Dit geeft als mogelijkheid dat de cellijn weer ingespoten kan worden in een rat om naar tumorgroei en uitzaaiingsprocessen te kunnen kijken. Om de rol van FAK te kunnen bestuderen is een zogenaamde remmer van FAK gebruikt: FAK related non-kinase, FRNK. Door FRNK tot expressie te brengen nemen de door FAK gemedieerde signalen af. Zowel in vitro als in vivo kan FRNK op een ieder gewenst moment tot expressie worden gebracht, oftewel: FAK kan op ieder gewenst moment geremd worden.

Hoofdstuk 1 is een introductie over het ontstaan, uitzaaien en de behandeling van borstkanker. **Hoofdstuk 2** is een samenvatting van de literatuur. Het beschrijft de rol van FAK in kanker en metastasering en de mogelijkheid van FAK als therapeutisch target bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen voor kanker. **Hoofdstuk 3** beschrijft de relatie tussen FAK en de activatie van de survival signalerings route PKB/PI3-kinase in reactie op het chemotherapeuticum doxorubicine. Wanneer MTLn3

cellen blootgesteld worden aan doxorubicine vindt een reorganisatie van het cytoskelet van de cel plaats, gelijktijdig met een toename in het aantal focal adhesions. Het eiwit PKB wordt verhoogd gefosforyleerd na blootstelling van de cellen aan doxorubicine. Na ongeveer 12 tot 16 uur beginnen de eerste cellen in apoptose te gaan. Wanneer dit echter tegengegaan wordt door overexpressie van het anti-apoptotische eiwit Bcl-2 of door caspase remmer zVAD vinden nog steeds de morfologische veranderingen van het cytoskelet en de focal adhesions plaats. Dit betekent dat deze veranderingen niet het gevolg kunnen zijn van de celdood maar juist een eerste reactie zijn van de cel op de blootstelling aan doxorubicine. Wanneer FAK geremd wordt door FRNK tot expressie te brengen, is er geen toename in PKB fosforylering en neemt de celdood toe. Wanneer de PKB survival route wordt geremd neemt de celdood ook toe. Uit deze data blijkt dat doxorubicine ervoor zorgt dat er een toename in focal adhesions komt, waarbij FAK de PKB signaal route activeert en zo zorgt voor het onderdrukken van Bcl-2 afhankelijke apoptose van MTLn3 cellen.

Om de rol van FAK te bestuderen in metastasering is naast vele in vitro studies ook gebruik gemaakt van studies in Fischer 344 ratten. In **hoofdstuk 4** wordt een verbeterd model beschreven om de MTLn3 cellen te gebruiken in Fischer 344 ratten. Na het inspuiten van de tumorcellen in de staartvene van de ratten gaan de tumorcellen via het bloed o.a. richting de longen. Wanneer de bloedvaten overgaan in de kleinere haarvaatjes raken de tumorcellen verstrikt en kunnen ze de longen in migreren. Echter, de MTLn3 cellen worden in de circulatie efficiënt gedood, waarschijnlijk door het immuunsysteem. Om toch de rol van FAK in het metastaseringsproces te kunnen onderzoeken is uitgezocht welke cellen van het immuunsysteem verantwoordelijk waren voor het doden van de tumorcellen. Dit waren de Natural Killer (NK) cellen. Door de ratten voor te behandelen met een antilichaam dat er voor zorgt dat de NK cellen tijdelijk uit het bloed van de rat worden verwijderd kunnen de tumorcellen de longen bereiken en in 4 weken uitgroeien tot longmetastasen. Hiermee is een model gecreëerd waarbij gekeken kan worden naar het effect van de remming van FAK op metastase vorming.

Deze proeven staan beschreven in **hoofdstuk 5**. Hierin wordt eerst het effect van de remming van FAK (expressie van FRNK) aangetoond op de verschillende processen die betrokken zijn bij metastasering. Expressie van FRNK remt de groei van de MTLn3 cellen, remt ook de migratie en de adhesie (hechting) van MTLn3 cellen. Remming van FAK heeft geen invloed op anoikis. Dit is een specifieke vorm van celdood, die wordt geïnduceerd door gebrek aan contact van de cel met andere cellen of met een matrix, zoals wanneer een cel reist in de bloedbaan of lymfevat. In de rat geeft remming van FAK een afname in de groei van de primaire tumor. Wanneer FAK geremd wordt op het moment wanneer de cellen in de staartvene van de rat gespoten wordt, zijn nog

maar 10% van de cellen in staat om tumoren te vormen vergeleken met cellen waarin FAK niet geremd is. Wanneer na een paar dagen FAK niet meer geremd wordt, blijft dit percentage zo laag. Dit geeft aan dat FAK cruciaal is in de beginfase van de experimentele metastasering: namelijk bij de adhesie van de cellen aan de bloedvaten, extravasatie van het bloedvat naar de longen en het uitgroeien van de individuele tumorcellen tot metastasen.

Hoofdstuk 6 beschrijft de rol van FAK in de resistentie van tumorcellen tegen het chemotherapeuticum doxorubicine onder in vivo condities. In deze proeven worden eerst primaire tumoren of metastasen gecreëerd in de afwezigheid van FRNK. Na ongeveer 10 dagen wordt FRNK tot expressie gebracht en enkele dagen later worden de ratten blootgesteld aan doxorubicine. Doxorubicine zelf heeft, zoals vaak gezien in de kliniek, geen effect op de grootte van de primaire tumor noch op het aantal long metastasen. Remming van FAK wanneer de primaire tumor of de longmetastasen al aanwezig zijn heeft ook geen effect. Combinatie van de remming van FAK en doxorubicine geeft echter een grote afname van de primaire tumorgroei en een spectaculaire afname van het aantal longmetastasen.

Tenslotte worden in **hoofdstuk 7** de routes ontrafeld die mogelijk verantwoordelijk zijn voor de effecten op metastasering en survival in reactie op de remming van FAK. Hiervoor is gebruik gemaakt van het bestuderen van gen-expressie profielen met behulp van DNA-microarray analyse. De expressie van genen is vergeleken tussen MTLn3 cellen die wel of geen FRNK tot expressie brengen en die wel of niet blootgesteld zijn aan doxorubicine. Een aantal routes lijkt veranderd geactiveerd te worden. Eén van de bevindingen is dat expressie van FRNK zorgt voor de afname van de expressie van 2 eiwitten (Fosl1 en JunB) die samen AP1 vormen. AP1 is een transcriptie factor complex dat betrokken is bij proliferatie en migratie.

Uit het onderzoek beschreven in dit proefschrift blijkt dat FAK inderdaad een belangrijke rol speelt bij metastasering en survival signalering. Daarom denken wij dat FAK een interessant target zou zijn voor de ontwikkeling van nieuwe anti-kanker geneesmiddelen. Vooral de combinatie therapie van enerzijds de remming van FAK en anderzijds de vaak gebruikte chemotherapeutica lijkt een hoopvolle potentiële toekomstige behandelingsstrategie. Deze combinatie-therapie zou vooral gebruikt kunnen worden bij tumorcellen die resistent zijn geworden tegen deze chemotherapeutica. Naast de bevindingen die beschreven staan in dit proefschrift is er nog veel vervolg onderzoek nodig om de potentie van deze combinatie therapie te bevestigen.

PUBLICATIES

van Nimwegen MJ, Verkoeijen S, van Buren L, Burg D, van de Water B.
Requirement for Focal Adhesion Kinase in the Early Phase of Mammary
Adenocarcinoma Lung Metastasis Formation.
Cancer Res. 2005 Jun 1;65(11):4698-706.

van Nimwegen MJ, van de Water B
Focal Adhesion Kinase: A Potential Target in Cancer Therapy.
Biochem Pharmacol, *In press*.

van Nimwegen MJ, Huigsloot M, Camier A, Tijdens IB, van de Water B.
Focal Adhesion Kinase and Protein Kinase B Cooperate to Suppress
Doxorubicin-Induced Apoptosis of Breast Tumor Cells.
Mol Pharmacol. 2006 Oct;70(4):1330-9.

van Nimwegen MJ, Verkoeijen S, Kuppen PJ, Velthuis JHL, van de Water B.
An Improved Method to Study NK-Independent Mechanisms of
Breast Cancer Lung Metastasis
Submitted

van Nimwegen MJ, Verkoeijen S, Chan K, Pont C, van de Water B.
Focal Adhesion Kinase (FAK) Inhibition Ameliorates Doxorubicin
Resistance of Mammary Adenocarcinoma Tumors and Lung Metastases
Submitted

van Nimwegen MJ, Yafeng M, Meerman J, van de Water B.
Genome-Wide Gene Expression Profiling of FAK-Dependent Signaling
in Doxorubicin-Induced Apoptosis of Breast Tumor Cells
In preparation

CURRICULUM VITAE

De auteur van dit proefschrift werd geboren op 15 februari 1979 te Middelharnis. Aldaar werd het VWO diploma in 1997 behaald aan de Rijks Scholen Gemeenschap. Vervolgens werd aangevangen met de studie Bio-Farmaceutische Wetenschappen aan de universiteit Leiden. Als onderdeel van deze studie werd een wetenschappelijke onderzoeksstage voltooid bij de sectie Toxicologie onder leiding van Dr. Bob van de Water. Hierbij werd de rol van FAK in cytostatica geïnduceerde apoptose onderzocht. Een tweede stage, getiteld 'Affymetrix DNA micro-array computer analyses', werd gevolgd bij Janssen Pharmaceutica (Beerse, België) onder leiding van Dr. Peter van der Spek. In 2001 won zij de Suzanne Hovinga award voor het beste stage-verslag van de studie Bio-Farmaceutische Wetenschappen. Het doctoraal examen werd in december 2001 afgelegd. In januari 2002 werd aangevangen met het in dit proefschrift beschreven onderzoek. Onder leiding van Prof. Dr. Bob van de Water werd als assistent in opleiding onderzoek verricht bij de sectie Toxicologie van het Leiden Amsterdam Center for Drug Research (LACDR). In april 2004 ontving zij de Tumor-cell biology best presentation award bij de jaarlijkse Tumor cel biologie meeting van het KWF. Sinds 1 oktober is zij werkzaam als Research Scientist bij het biotechnologie bedrijf Stem Cell Innovations.

The author of this thesis was born on February 15 1979 in Middelharnis, The Netherlands. She obtained her secondary school diploma at the Rijks Scholen Gemeenschap, after which she started studying Bio-Pharmaceutical Sciences at the University of Leiden. In the finishing stages of her study, she conducted two internships: in the first she studied the role of FAK in cytostatics-induced apoptosis under supervision of Dr. Bob van de Water. In her second internship, she developed Affymetrix DNA micro-array computer analyses methods at Janssen Pharmaceutica (Beerse, Belgium) under supervision of Dr. Peter van der Spek. In 2001, she received the Suzanne Hovinga Award for the best internship report of the Bio-Pharmaceutical Sciences students. After obtaining her Masters degree in December 2001, she started her PhD-research at the division of Toxicology of the Leiden/Amsterdam Center for Drug Research (LACDR) under supervision of Prof. Dr. Bob van de Water, of which the results are described in this thesis. In April 2004, she received the best presentation award at the annual Tumor-cell biology meeting of the Dutch Cancer Foundation (KWF). As of October 1st 2006, she is employed as Research Scientist at Stem Cell Innovations.

DANKWOORD

Eindelijk, na ruim vier jaar proeven doen gevolgd door nog een paar maanden schrijven, is het tijd voor de meest gelezen pagina van het proefschrift. Ondanks dat het onmogelijk is iedereen te vermelden, wil ik hier graag een aantal mensen noemen die allemaal op hun eigen manier hebben bijgedragen aan het totstandkomen van dit proefschrift.

Allereerst wil ik mijn mede-aio's noemen: Raoef, Saertje, Marjo, Maaïke, Sylvia, en later ook Martine en Maya. De gezamenlijke werkbesprekingen waren erg nuttig en gelukkig was er ook genoeg afleiding tijdens koffiepauzes, borrels en labuitjes. Liesbeth, zonder jouw hulp in de dierstallen en, nog belangrijker, bij het verwerken van alle weefsels had dit boekje er heel anders uitgezien. Bij het *in vivo* deel mogen Johan en Fred ook niet onvermeld blijven: naast de hulp bij de verzorging van de ratjes was het, zeker ook mede dankzij jullie, vaak erg gezellig in de dierstallen. Chantal, jouw dier-experimentele ervaring was ook erg nuttig en ondanks de heftige 'sessies' hebben we heel veel gelachen. Waarschijnlijk denk je hier nog wel eens aan als je de inktvlekken in de sectiekamer ziet. Verder mogen Danny, Merei (onze samenwerking heeft een mooi artikel opgeleverd), Ine, Hans en alle andere medewerkers, inclusief stage-studenten, van de vakgroep toxicologie niet onvermeld blijven in dit dankwoord.

Vanzelfsprekend wil ik ook 'mijn' stagestudenten noemen: Annamarië en Chin Chin, jullie waren mijn eerste stage-studenten, Petra en Kayi, jullie begeleidde ik samen met Saertje. Ik vond het erg leuk jullie te begeleiden en het heeft mij ook zeker meer opgeleverd dan de data die jullie tijdens je stages bij elkaar gepipetteerd hebben.

Lieve Saertje, het doorlopen van het promotietraject kost bloed (geen uitleg nodig), zweet (hard werken, vaak in de weekenden en met voorkeur tijdens feestdagen) en tranen (o.a. in de dierstallen, maar gelukkig heel vaak van het lachen om foute grappen). Het samenwerken ging ons goed af: we hebben twee studenten begeleid en een mooi artikel geschreven. Belangrijker, je hebt heel veel bijgedragen aan mijn fijne tijd bij tox! Ik ben dan ook erg blij dat je mijn paranimf wilt zijn. Marieke, jij was tijdens onze koffie-sessies buiten voor het Gorlaeus (en tijdens onze D.O.M. sessies 's avonds) altijd een goed luisterend oor waar ik mijn aio-frustraties bij kwijt kon.

Ook familie mag in deze niet onvermeld blijven. Als eerste mijn lieve ouders, die me altijd gesteund hebben. Het doorzettingsvermogen dat ik van jullie meegekregen heb is zeker nuttig gebleken. De weekenden bij ((stief)schoon)ouders waren altijd erg goed om even afstand te nemen van de drukte op het lab. Ook de gezellige avonden, en natuurlijk de skivakanties, met Léon en Petra hebben zeker bijgedragen aan het relativeren van de aio-problemen. Léon, ik ben trots dat je naast me staat als paranimf!

Naast dit proefschrift heeft mijn aio-periode bij tox me nog iets veel belangrijkers gebracht. Jurjen, eerst was je een collega, nu, via vriend en geliefde, ben je mijn man! Jouw onvoorwaardelijke liefde gecombineerd met je onuitputtelijke geduld is onbeschrijfbaar belangrijk geweest voor mij. Ik heb wat goed te maken en kijk dan ook vol verlangen en vertrouwen uit naar onze toekomst zonder proefschrift-stress!

