

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19756> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Naber, Hildegonda Petronella Henriëtte

**Title:** TGF-beta and BMP in breast cancer cell invasion

**Issue Date:** 2012-09-05

## **Chapter 9**

# **Nederlandse samenvatting voor niet- ingewijden**

## **List of Publications**

## **Curriculum vitae**

# Nederlandse samenvatting voor niet-ingewijden

De Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) familie omvat eiwitten zoals TGF- $\beta$ , activines en Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), die door cellen uitgescheiden worden en vervolgens in tal van biologische processen een belangrijke rol spelen. Het eiwit TGF- $\beta$  werd ontdekt als een groeifactor die cellen kan aanzetten tot verandering in hun vorm (morfologie). BMPs werden geïdentificeerd als groeifactoren aanwezig in de botmatrix die botvorming kunnen induceren. Later werd ontdekt dat zowel TGF- $\beta$  als BMPs ook belangrijk zijn voor de ontwikkeling van het embryo. In een volwassen organisme zijn TGF- $\beta$  en BMPs van belang om het inwendige milieu van een cel in balans te houden. Verstoring van TGF- $\beta$  en BMP signalering kan leiden tot ziektes, zoals bijvoorbeeld vaatafwijkingen, fibrose en kanker.

TGF- $\beta$  en BMPs kunnen aan de buitenkant van cellen binden, via zogenaamde receptoren, en daarmee diverse processen in die cel op gang brengen. Binding van TGF- $\beta$  aan deze receptoren leidt tot vorming van een complex tussen type I en type II receptoren, waarbij de type II receptoren de type I receptor fosforyleert. Deze receptor fosforyleert op zijn beurt andere signaleringseiwitten, waarvan de receptor Smad eiwitten (R-Smads) de belangrijkste zijn. Door deze fosforylering kunnen de R-Smads binden aan Smad4 waarna het R-Smad/Smad4-complex naar de kern van de cel verplaatst. In de kern van de cel bindt het R-Smad/Smad4 complex aan het DNA en beïnvloedt de expressie van een groot aantal genen.

TGF- $\beta$  heeft een dubbel gezicht in kanker; in vroege stadia remt het de groei van cellen en induceert het de dood (apoptose) van kankercellen. Het werkt in eerste instantie dus als kanker-onderdrukkend eiwit, terwijl het in latere stadia juist invasie en het uitzaaien van kankercellen bevordert.

Om de oncogene rol van TGF- $\beta$  beter te bestuderen, hebben wij een test opgezet waarbij TGF- $\beta$  invasie induceert. Deze test wordt beschreven in **hoofdstuk 3**. Hierbij is gebruik gemaakt van gebruik van ronde bolletjes met borstkankercellen, zogenaamde

spheroiden. De organisatie in zo'n sferoid lijkt meer op de organisatie van cellen in een tumor dan in de bestaande modellen die gebruik maken van cellen die groeien in een enkele laag, een monolayer. Deze spheroids worden geïmplant in een collageen gel. Na 2 dagen is een duidelijk verschil te zien tussen spheroids die behandeld zijn met TGF- $\beta$  en controle spheroids. Als in deze assay cellen worden gebruikt die verschillende stadia van het ontstaan van kanker vertegenwoordigen, namelijk normale cellen, cellen die goedaardige tumoren vormen en cellen die kwaadaardige tumoren vormen en cellen die kunnen uitzaaien. De invasie van deze cellen correleert met hun kwaadaardigheid, dus de kwaadaardige cellen invaderen het meest.

Met dit model konden we belangrijke mediators van TGF- $\beta$ -geïnduceerde invasie identificeren. Dit is beschreven in **hoofdstuk 4**. Remming van Smad4 of de R-Smad Smad3 leidde tot verminderde TGF- $\beta$ -geïnduceerde invasie, wat een belangrijke rol voor deze signaleringseiwitten impliceert. Deze remming leidde ook tot verminderde transcriptie van inductie van de genen die coderen voor matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9. Deze enzymen zijn belangrijk voor het afbreken van de extracellulaire matrix zodat cellen verder kunnen bewegen, maar ze activeren ook groeifactoren en breken eiwitten af die de hechting (adhesie) tussen cellen verzorgen, waardoor de cellen dus vrijelijker kunnen bewegen.

Remming van MMP2 en MMP9 verminderde ook de TGF- $\beta$ -geïnduceerde invasie. Dus activatie van Smad3 en Smad4 door TGF- $\beta$  leidt tot hogere expressie van MMP2 en MMP9, die een belangrijke rol spelen bij invasie van kankercellen.

Uiteraard kunnen ook andere factoren een rol spelen bij TGF- $\beta$  geïnduceerde invasie. TGF- $\beta$  induceert in epitheliale cellen de overgang van een epitheliaal naar een mesenchymaal uiterlijk (EMT). De meeste kankercellen hebben hun oorsprong in het epitheel; dit zijn cellen die stevig aan elkaar vastzitten en dus niet heel beweeglijk zijn. Tijdens EMT verandert de epitheliale kankercel in een meer beweeglijke, mesenchymale kankercel, waarbij de expressie van eiwitten zoals E-cadherine, die adhesie tussen cellen verzorgen, wordt onderdrukt. Een aantal regulatie eiwitten (transcriptiefactoren) kunnen de expressie van E-cadherine onderdrukken, waaronder Snail, Slug, ZEB1 and Twist. In de kanker cellen

induceerde TGF- $\beta$  de expressie van Snail en Slug. Dit wordt beschreven in **hoofdstuk 6**. Overexpressie van Slug en Snail leidde tot meer invasie. Deze bevindingen suggereren dat inductie van EMT door TGF- $\beta$  belangrijk is voor de invasie van borstkankercellen.

BMP-7 kan TGF- $\beta$ -geïnduceerde EMT remmen. Ook remt BMP-7 het uitzaaien van borskankercellen naar de botten. Daarom werd in **hoofdstuk 5** het effect van BMP-7 op TGF- $\beta$ -geïnduceerde invasie. BMP-7 remde de TGF- $\beta$ -geïnduceerde invasie in een kwaadaardige tumor cellijn, maar niet in een goedaardige tumor cellijn. Maar BMP-7 liet de TGF- $\beta$ -geïnduceerde groeiremming ongemoeid. Dit suggereert dat BMP-7 alleen oncogene invasie kan remmen.

Ook onderzochten we welke TGF- $\beta$ -geïnduceerde genen door BMP-7 worden geremd. Hiertoe behoorden de integrine subunits  $\alpha_v$  en  $\beta_3$ , die samen integrine  $\alpha_v\beta_3$  complex vormen. Integrines verzorgen de adhesie van cellen aan de extracellulaire matrix, waardoor cellen zich kunnen afzetten tegen de extracellulaire matrix om zich voort te bewegen. Verder induceert binding van een integrine aan de extracellulaire matrix een signaal in de cel die leidt tot een grotere beweeglijkheid. Remming van integrin  $\alpha_v\beta_3$  leidde, net als BMP-7, tot remming van TGF- $\beta$ -geïnduceerde invasie. Overexpressie van integrin  $\beta_3$  zorgde ervoor dat BMP-7 de TGF- $\beta$ -geïnduceerde invasie niet meer kon remmen. Dus de remming van integrine  $\alpha_v\beta_3$  door BMP-7 draagt bij aan het remmende effect van BMP-7 op TGF- $\beta$ -geïnduceerde invasie. BMP signalering is vaak ontregeld in kanker. Hoewel BMP-7 meestal een anti-oncogene rol wordt toegedicht, hebben andere BMPs, zoals BMP-2 en BMP-4 een oncogene rol. Wat de rol van BMP signalering betreft in kanker is niet zoveel bekend als voor TGF- $\beta$  signalering. In **hoofdstuk 7** wordt daarom een zoektocht (screen) naar nieuwe regulator eiwitten beschreven waarbij verschillende enzymen met fosforylerings activiteit (kinases) tot overexpressie werden gebracht in tumor cellen. Er werd vervolgens gekeken naar het effect op BMP signalering. In deze screen identificeerden we zowel bekende als nieuwe kinases die BMP signalering kunnen beïnvloeden. Zo heeft CDK8 een negatief effect op BMP-signalering, terwijl RPS6KA4 BMP de signalering stimuleert. Verder onderzoek zal uitwijzen hoe belangrijk deze kinases zijn voor oncogene BMP signalering.

Samenvattend, in dit proefschrift is onderzoek gedaan naar eiwitten welke een belangrijke

rol spelen bij TGF- $\beta$ -geïnduceerde invasie van borstkankercellen, namelijk Smad3, Smad4, MMP2 en MMP9. Ook is onderzocht wat het effect van BMP-7 op deze invasie is en daarbij een belangrijke rol ontdekt voor integrine  $\alpha_v\beta_3$ . Daarnaast zijn er twee nieuwe kinases gevonden die mogelijk een rol hebben in BMP signalering. Tenslotte is gevonden dat Slug en Snail, twee belangrijke mediators van EMT, ook van belang zijn voor invasie. De kennis opgedaan in dit proefschrift zal op de lange termijn kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van medicijnen gericht tegen de mediators van de oncogene rol van TGF- $\beta$ .