



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Desease models in vertebrates : from hypoxia to cancer**

Santos Marques, I.J. dos

### **Citation**

Santos Marques, I. J. dos. (2011, June 29). *Desease models in vertebrates : from hypoxia to cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17742>

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/1887/17742>

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

# CHAPTER 6

## SAMMENVATING

Proefdieren worden al sinds lange tijd in wetenschappelijk onderzoek gebruikt. Hoewel in studies van menselijke ziekten zoals kanker het meeste onderzoek gewoonlijk wordt gedaan met muismodellen, is er in het laatste decennium een nieuw model opgedoken voor gewervelde dieren, de zebravis. Dit organisme heeft inmiddels een belangrijke plaats gekregen als model in ontwikkelingsstudies. Meer onlangs is dit diermodel een werktuig geworden om een aantal menselijke ziekten te begrijpen zoals kanker of studies aan hypoxia en het immuun systeem. In deze studies worden zowel embryo's, larven en volwassen dieren gebruikt. De voordelen om dit model in menselijke ziektestudies te gebruiken zijn de grote hoeveelheden eieren die te verkrijgen zijn van een enkele kruising dat de mogelijkheid geeft op grotere schaal experimenten uit voeren; de snelle ontwikkeling van ei naar larve verkort de lange wachttijden tijdens experimenten; de doorzichtigheid van embryo's en larven zijn zeer nuttig om de symptomen en ontwikkeling van een ziekte direct te volgen; ten slotte, de afwezigheid van een adaptief immuunsysteem in de vroege stadia van ontwikkeling maakt het mogelijk om, zonder immunosuppressor medicijnen te gebruiken, xenotransplantatie van tumor cellen toe te passen zonder het risico van directe afstoting.

In dit proefschrift is de waarde van het zebravis model in de studie van menselijke ziekten gedemonstreerd. In hoofdstuk 2 beschrijf ik een analyse van de veranderingen in het zebravis hart onder chronische voortdurende hypoxia (CCH). Een begrip van hoe in een teleost vis chronische voortdurende hypoxia kan worden weerstaan kan mechanismen aantonen die permanente schade als gevolg hiervan voorkomen. Wij hebben gedemonstreerd dat hoewel zebravis onder CCH kan overleven, het hart morfologische en genetische veranderingen

ondergaat. Wij toonden aan dat CCH in zebravis kleinere ventriculaire uitloop zones, verminderde lacunes en toegenomen hartmyocyt dichtheden in het hart veroorzaakt. Vergelijkend in zoogdieren resulteert hetzelfde soort blootstelling aan hypoxia in chronische hartstilstand en verlies van hartmyocyten. Maar behalve de morfologische veranderingen die in het hart van de zebravis onder chronische voortdurende hypoxia gebeuren, waren wij ook in de onderliggende genexpressieveranderingen van deze aanpassingen geïnteresseerd. Door een transcriptoom analyse vonden wij diverse genen die geïnduceerd of gereprimeerd zijn onder CCH condities. Wij vonden genregulatie in een transcriptioneel netwerk van het serumreactieonderdeel die in tegenstelling zijn zoals beschreven in zoogdieren. Wij onthulden ook veranderingen van genexpressie die door CCH zijn aangezet die nog niet eerder zijn beschreven, bijvoorbeeld de verandering van expressie van twee notch receptoren. Enkele genen verbonden met menselijke hartpathologie bleken ook geïnduceerd in deze studie te zijn. Een voorbeeld is het complement component C9 en haptoglobine, twee kenmerken voor myocardiaal infarct. Wij hebben ook een inductie van fetuin- $\alpha$  waargenomen. Lage niveaus van dit gen zijn geassocieerd met hartstilstand in muizen. Het hogere expressie niveau van fetuin- $\alpha$  in het zebravis hart kan mogelijk een hoger tolerantie niveau van CCH bewerkstelligen. De veranderingen die we in deze studie hebben geïdentificeerd zijn mogelijk belangrijk voor het vermogen van teleosten om zich aan strenge hypoxia aan te passen. Hoe beter wij begrijpen hoe bepaalde dieren zich aan hypoxia aan kunnen passen des te beter kunnen wij strategieën ontwikkelen om de lange termijn effecten te voorkomen of om hiermee gerelateerde ziekten te genezen.

Met deze eerste studie demonstreerden wij de veelzijdigheid en weerstand van het zebravis model om extreme hypoxia omstandigheden te weerstaan.

Vervolgens demonstreerden wij in hoofdstuk 3, dat de zebravis een nuttig in vivo diermodel is voor de snelle analyse van invasie en metastatisch gedrag van menselijke tumor monsters. Van kleine explantaten van menselijke tumoren uit de maag, die fluorescerend gemerkt waren, hebben wij het metastatisch gedrag na transplantatie in zebravis embryo's onderzocht. Wij volgden met succes het proces van invasie, migratie en micro-metastaseformatie direct tijdens het plaatsvinden van dit proces. Wij zijn begonnen met het implanteren van twee verwante menselijke pancreas kankercellijnen, één met invasieve kenmerken (PaTu8988t) en de andere met een niet-invasief gedrag (PaTu8988s), in de dooier van de twee dagen oude zebravis larven. De geïmplanteerde cellen werden dan gevolgd voor drie dagen. Wij merkten op dat de cellijn met invasieve eigenschappen inderdaad verplaatst van de positie van implantatie, intravaseerd in de bloedstroom en binnendringt in afgelegen weefsels. Deze eerste experimenten valideerden ons model als een nuttig werktuig om de metastatische eigenschappen van menselijke kankercellijnen te bestuderen. We hebben vervolgens ons model gebruikt om te testen of menselijke tumors die in de zebravis zijn getransplanteerd ook metastatisch gedrag vertoonden. Wij konden bevestigen dat de vroege embryo's en gebruikte larven de voornaamste tumor xeno-implantaten niet hadden afgestoten, en dat die cellen van de geïmplanteerde xeno-implantaten waren losgekomen, de vis bloedsomloop binnen zijn gegaan en binnen 24 uur in afgelegen weefsels en organen zijn verschenen. De micrometastase van een aantal van deze cellen kon op histologisch niveau worden waargenomen. Verder hebben wij de resultaten van

toediening van protease remmers op de indringing van ingeplanteerde tumorcellen en tumorweefselfragmenten onderzocht en dit bevestigde dat twee verschillende protease remmers invasie van de geïmplanteerde cellen en weefsels konden voorkomen. Het scala van experimenten die uitgevoerd zijn met dit xeno-transplantatie systeem heeft ons voorzien van belangrijke informatie die kan worden gebruikt voor het opzetten van een snelle testmethode voor medicijnen die invasie en metastaseformatie van menselijke tumors kunnen voorkomen. Wij demonstreerden hier het nut van de zebrafish embryo's als een *in vivo* model voor de analyse van metastatisch gedrag van menselijke tumorcellen. De kracht van dit model is onder andere dat we direct de formatie van micrometastase kunnen onderzoeken zonder de noodzaak om het testdier te offeren, zoals vaak met zoogdiermodellen gebeurt. Bovendien kunnen experimentele resultaten in een korte tijdsperiode worden verkregen en is daarmee tijdsbesparend vergeleken met andere diermodellen.

In hoofdstuk 4 gebruikten wij het zebrafish model om het effect van retinoic acid receptorantagonisten in pancreaskanker te demonstreren. Wij hebben microRNA 10a geïdentificeerd als een belangrijke bemiddelaar van metastaseformatie in pancreastumorcellen en hebben een model voor zijn regulerende mechanisme opgesteld. Wij bevestigden dat miR-10a expressie in pancreastumorencellen en in chronische pancreatitis en pancreastumorweefsel is toegenomen. Daarna implanteerden wij onze monsters van menselijke pancreascellen en menselijke pancreasweefsels (tumorweefsel, chronische pancreatitis en normaal pancreasweefsel) in de zebrafish embryo's om de invasie en metastatisch gedrag van onze monsters te bestuderen. Nadat we de kankervormende eigenschappen van ons materiaal hadden bepaald, onderzochten wij wat voor rol miR -10a in

het metastatische gedrag van onze cellijnen en weefsels speelde. Wij bevestigden dat overexpressie van miR-10a siRNA voldoende was voor niet invasieve cellijnen om invasief en metastatisch gedrag te verwerven. In een tegenovergestelde aanpak bleek het belemmeren van miR-10a met morpholino's voldoende om het metastatische gedragkenmerk van een aantal van de cellijnen en voornaamste menselijke tumors te voorkomen. Zodra wij hadden bewezen dat miR-10a inderdaad een rol in invasie en metastase in pancreaskanker kan spelen, hebben wij ons vervolgens gericht op de identificatie van regulators van dit microRNA. Stroomopwaarts ontdekten wij dat miR-10a door een retinoic acid signaal in pancreaskankercellen geregeld wordt. Er was reeds gedemonstreerd dat retinoic acid derivaten als antikanker middelen zouden kunnen worden gebruikt, ten gevolge van hun pleiotrope regulerende functie in celdifferentiatie, groei, vermenigvuldiging en apoptose. In ons onderzoek tonen wij aan dat RAR $\alpha$  antagonisten anti-metastatische eigenschappen hebben en dat het miR-10a expressie repressieert, daarmee zijn potentieel als anti-metastatisch medicijn demonstrerend, tenminste met betrekking tot pancreaskanker.

Wij vonden ook dat miR-10a expressie geïnduceerd was onder condities van chronische pancreatitis. Het is echter goed bekend dat chronische omstandigheden van pancreatitis een risicofactor voor de ontwikkeling van pancreaskanker zijn, en dit zou daarom misschien de hogere expressie van miR-10a in deze gevallen kunnen verklaren. Hoewel, wij momenteel niet de nauwkeurige rol van miR-10a in de vooruitgang van chronische pancreatitis naar pancreaskanker kunnen analyseren, bediscussieerden wij dat miR-10a expressie betrokken is bij complexe regelmechanismen die de kwaadaardige transformatie van een cel controleren.

Stroomafwaarts vonden wij dat HOXB1 en HOXB3 evenals de cadherin/catenin complex eiwitten E-cadherin,  $\alpha$ -catenin en  $\beta$ -catenin doelen voor miR-10a zijn. Met behulp van siRNAs om specifiek HOXB1 en HOXB3 uit te schakelen, vonden wij dat onderdrukking van deze genen in de gebruikte niet-metastatische cellijn, Patu8988s, resulteerde in een invasieve en metastatische cellijn. Dit demonstreert dat deze genen als metastase suppressor genen functioneren. Soortgelijke resultaten zijn al in eerdere studies opgemerkt, die ook de remming van metastatisch gedrag door miR-10b aangetoond hebben (referentie 154).

Dankzij onze resultaten konden wij een model opstellen waarin onderdrukking van HOXB1 en HOXB3 invasief en metastatisch gedrag verleent aan pancreaskankercellijnen: retinoïc acid stimuleert de dimerisatie van RAR/RXR retinoïd receptoren, die aan RAREs binden, en daarmee een toename van miR-10a expressie bewerkstelligen. Dit onderdrukt op zijn beurt HOXB1 en HOXB3, die invasie en metastatisch gedrag bevorderen. Aan de andere kant zorgt transcriptionele repressie van miR-10a door een selectieve remmer ervoor dat de onderdrukking van HOXB1 en HOXB3 wordt opgeheven en voorkomt hierdoor invasief en metastatisch gedrag. Als conclusie van dit onderzoek kunnen we vaststellen dat beide RAR antagonisten evenals miR-10a remmers als veelbelovende anti-metastatische stoffen gebruikt kunnen worden, als deel van een anti-metastatische therapie.

Ter afronding, proefdieren zijn lang als modellen in wetenschappelijk onderzoek of als testonderwerpen voor nieuwe therapieën tegen menselijke ziekten gebruikt om ons beter te helpen om ziekteontwikkeling en ziekteprogressie te begrijpen. Gewervelde dieren zijn het meest geschikte diermodel voor onderzoek aan menselijke ziekten omdat zij sterker verwant zijn aan de mens



dan bijvoorbeeld insecten en wormen die ook voor biologisch onderzoek gebruikt worden. Het meest gebruikelijke diermodel is vermoedelijk de muis, maar in recente jaren heeft een nieuw model, de zebravis zijn intrede gedaan en dit wordt inmiddels ruim erkend als een belangrijk onderzoeksmodel in menselijke ziektestudies. In dit proefschrift heb ik het nut gedemonstreerd van de zebravis als een ziektemodel voor gewervelde dieren. We hebben gebruik gemaakt van zijn capaciteit om extreme condities van hypoxia te doorstaan en te overleven, en dit kan ons helpen om nieuwe therapieën te vinden om in mensen de schadelijke gevolgen af te weren. Vervolgens is de aandacht gegaan naar het nut van de zebravis in kankerstudies als een tijdsbesparend model om goed gevestigde modellen, zoals de muis, aan te vullen en dat zeer waardevol kan zijn in het ontwikkelen van nieuwe therapieën om tumorformatie, vooruitgang en metastaseformatie te bestrijden. Ten slotte gebruikten wij ons gewerveld model in een casestudy, waar wij de rol analyseerden die door miR-10a in pancreaskanker wordt gespeeld.