



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Pathogenesis and treatment of skeletal metastasis : studies in animal models**

Buijs, J.T.

### **Citation**

Buijs, J. T. (2009, January 21). *Pathogenesis and treatment of skeletal metastasis : studies in animal models*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13413>

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/1887/13413>

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

# Chapter 9

**Summary**  
**Samenvatting**  
**List of Abbreviations**  
**List of Publications**  
**Curriculum Vitae**





## Summary

The skeleton is one of the most common organs to be affected by metastatic disease. However, only a restricted number of solid cancers, especially those of the breast and prostate, are responsible for the majority of the bone metastases. Bone metastases are a major cause of morbidity, characterized by severe pain and high incidence of fractures, spinal cord compression and bone marrow aplasia requiring hospitalization. Despite the high frequency of skeletal metastases, the molecular mechanisms underlying the predisposition for tumors to colonize bone are poorly understood and treatment options are often unsatisfactory. The focus of this thesis was to better understand the processes that contribute to the formation of distant metastasis (**chapter 2**), particularly to bone (**chapter 4–7**), as well as to explore new treatment strategies with conventional (**chapter 4 and 5**) and novel therapeutic molecules (**chapter 6 and 7**) using optical imaging to sensitively monitor growth, dissemination and metastasis in mouse models (**chapter 3–7**).

Although current clinicopathologic parameters are widely used to predict clinical outcome, the clinical behavior of prostate and breast cancer can still be quite different. In order to improve breast and prostate cancer management, better and reliable markers are needed to distinguish patients with good and poor prognosis.

In **chapter 2** we demonstrated that, in addition to the tumor blood vessels, thin periodic acid-Schiff-positive (PAS+) patterns may exist in invasive ductal carcinoma (IDC) of the breast and their lymph node metastases. More importantly, the complexity of the PAS+ patterns in lymph node metastases was related to poor prognosis. Moreover, we found that the presence of the most complex thin PAS+ pattern — the PAS+ network — in lymph node metastases and stage classification of the tumor were the only two independent risk factors associated with the occurrence of a distant metastasis. Additionally, the presence of a PAS+ network in a positive lymph node is the factor most strongly associated with poor prognosis. Therefore, by examining IDC patients for the presence of PAS+ networks in their lymph node metastases, the clinical behavior of this heterogeneous group of breast cancer patients can be better predicted. This may ultimately lead to improved management of the disease.

Animal models have become important tools to study the molecular mechanisms that are involved in the formation of bone metastases and have adequately served as pre-clinical models to test new drug compounds and strategies. The formation of bone metastases after injection of MDA-MB-231 breast cancer cells into the left cardiac ventricle of immunodeficient (*nu/nu*) mice has been one of the most widely used bone metastasis models. The subsequent formation of cancer-induced osteolysis can be monitored by

radiographic detection. However, radiographic detection is an indirect and insensitive method to analyze bone metastases. Therefore, we described in **chapter 3** a technique that is able to directly monitor and quantify the distribution and growth of luciferase-transfected (luc+) cancer cells in intact animals using whole-body bioluminescent reporter imaging (BLI). In comparison with indirect detection using radiography, the BLI method yields higher sensitivity, reliability, and statistical power. The remarkable sensitivity of the optical imaging in detecting microscopic bone marrow metastases allowed us to detect bone micrometastatic deposits of 0.5 mm<sup>3</sup> volume, preceding the appearance of radiological evident osteolysis by 2 weeks. At present, the use of new CCD cameras and better luciferase expression have yielded even higher sensitivity. In the subsequent chapters (**4-7**), BLI was used to study the molecular mechanisms in bone metastasis, as well as to develop new treatment strategies with novel and conventional compounds.

Interference with the microenvironmental growth support has been proposed as an attractive strategy for decreasing metastatic tumor growth. Agents that specifically decrease bone resorption and remodeling, such as bisphosphonates, are available and are used clinically for the protection of bone destruction by metastases from different primary tumors. In **chapter 4**, we have shown that clinically relevant doses of bisphosphonates, administered before the establishment of micrometastases (preventive protocol), reduced the number of developing bone metastases by 70%. Bisphosphonate treatment also inhibited the early progression of tumor growth in the small number of still developing metastases. However, when bisphosphonates were given to animals with established bone metastases (curative protocol) they did not inhibit the growth of breast cancer cells in the bone microenvironment, despite a substantial anti-osteolytic effect.

The lack of tumor growth response may be due to the magnitude of suppression of bone resorption and hence the potency or dose of bisphosphonates given, or due to the mechanism of bone resorption inhibition by bisphosphonates. In **chapter 5** we investigated these mechanisms in more detail in an experimental model of intra-tibial injection of human breast cancer cells. We assessed the effects of very high doses of the most potent bisphosphonate currently available, zoledronic acid, and we compared these to the effects of osteoprotegerin, which inhibits bone resorption by a different mechanism of action. As expected, both zoledronic acid and osteoprotegerin treatment markedly suppressed bone resorption, protected the integrity of bone trabeculae and prevented the development of osteolytic lesions. At the end of the experiment intraosseous tumor burden was reduced, but extramedullary growth was not affected. Although total (intra-bone and extramedullary) tumor burden in treated groups appeared less compared to controls, this difference was not significant. Taken together, using BLI for monitoring and quantifying tumor burden, our data favor the hypothesis that metastatic cancer cells in

bone, after an initial growth phase that depends on their interaction with the BM stroma and extracellular bone matrix, become increasingly independent of microenvironmental growth factor support and are self-maintained by autocrine mechanisms.

In order to become invasive, cancer cells have to lose epithelial characteristics, such as expression of E-cadherin. The acquisition of an invasive phenotype is reminiscent of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) that occurs during embryonic development. It has long been recognized that transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), by signaling via the Smad pathway, can induce EMT in many different cell types in different settings, including embryogenesis, wound healing, and carcinogenesis. In contrast, bone morphogenetic protein 7 (BMP7) was shown to counteract TGF- $\beta$ -induced EMT and induce the opposite process, a mesenchymal-to-epithelial transition (MET), in renal epithelial cells.

In **chapter 6 and 7**, we described that BMP7 expression in breast and prostate cancer cell lines *in vitro* correlated with E-cadherin expression, and inversely correlated with aggressiveness and expression of the mesenchymal marker vimentin. Furthermore, we demonstrated that BMP7 induced MET and inhibited TGF- $\beta$ -induced EMT in breast and prostate cancer cells. In clinical samples, decreased BMP7 expression was observed in prostate cancer cells when compared to normal epithelial prostatic cells. In addition, decreased BMP7 mRNA expression levels in primary tumor were correlated with formation of bone metastases in breast cancer patients. In line with its inhibitory role in cancer progression, we show that stable overexpression of BMP7 in MDA-MB-231-B02/luc+ breast cancer cells inhibited *de novo* formation and progression of osteolytic bone metastases. In **Chapter 6**, we examined the effects of daily intra-venous administration of BMP7 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ) and observed significant inhibition of orthotopic and intra-bone growth of luciferase transfected MDA-MB-231-B/luc+ cells in nude mice. BMP7 treatment also inhibited PC-3M-Pro4/Luc+ prostate cancer bone metastatic growth, but not orthotopic growth. Clearly, the tumor microenvironment is an important determinant of the therapeutic response to BMP7 in prostate cancer.

To summarize our data described in **chapter 6 and 7**, we propose a role for BMP7 expression in the maintenance of epithelial cell behavior in the breast and prostate. In normal epithelial cells BMP7 can induce the E-cadherin expression, repress vimentin synthesis, and prevent EMT. In later stages of tumorigenesis, because of loss of BMP7 expression by cancer cells and/or resistance of these cells to the BMP7 secreted by surrounding normal epithelial cells, malignant cells may lose their expression of E-cadherin under the influence of TGF- $\beta$  leading to EMT and subsequent metastatic spread. In prostate cancer, TGF- $\beta$  may even contribute to the epithelial homeostasis as long as BMP7 remains present as well.

In this thesis, several processes have been unraveled that are critically important in the formation of metastases, particularly to bone. The presence of PAS+ networks in lymph node metastases from breast cancer is a prognostic factor for the formation of distant metastases. In addition, low BMP7 mRNA expression levels in primary breast cancer may be used as a prognostic indicator for the formation of bone metastases. Both these markers may be used to predict which patients are at high risk for distant metastases and become the rationale to offer patients a more adequate treatment, e.g., prophylactic bisphosphonate treatment for patients that have low BMP7 levels.

Altogether, we propose a model in which disseminating tumor cells (DTCs) from osteotropic cancers are spread throughout the body with a modest higher propensity for bone. Only DTCs with stem-cell like characteristics such as an indefinite capacity of self-renewal, which end up in a suitable environment, can ultimately develop into a metastasis. In the bone environment cancer cells can stay dormant for many years until a bone remodeling unit (or basic multicellular unit, BMU) comes into close proximity. Osteoclastic bone resorption within the BMU induces high local concentrations of growth factors such as TGF- $\beta$ , which may stimulate the outgrowth of a micrometastatic deposit into an overt bone metastasis. Also, therapies that can reduce the actual number of BMUs, like treatment with osteoprotegerin and bisphosphonates, may inhibit the formation of bone metastases. This may also be true for compounds that antagonize the pro-tumorigenic effects of TGF- $\beta$ , such as BMP7. In addition, BMP7 may not only inhibit TGF- $\beta$ -induced EMT, but also be involved in the homeostasis of normal breast and prostate epithelium, representing thus a putative novel therapeutic molecule for breast and prostate cancer.

## Samenvatting

Van een tumor kunnen cellen losraken, die via het bloed en de lymfe op andere plekken in het lichaam terecht komen en daar ook een tumor kunnen vormen. Dit proces heet uitzaaien. Al sinds de 19e eeuw is bekend dat bepaalde type tumoren, zoals borst- en prostaatkanker, vaker naar bot uitzaaien ('metastaseren') dan andere tumoren. In de Westerse wereld komen borst- en prostaatkanker bovendien het vaakst, bij respectievelijk vrouwen en mannen, voor. Uitzaaiingen in het bot veroorzaken grote morbiditeit, gekenmerkt door botpijnen, botbreuken en verzakkingen van de wervelkolom. Volgens welke exacte moleculaire mechanismen bepaalde tumoren naar bot uitzaaien is echter nog niet bekend. Daarnaast is er nog geen genezende behandeling voor handen.

Het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift was erop gericht om de processen die betrokken zijn bij (bot)metastasering te ontrafelen (**hoofdstuk 2, 4-7**), en tevens nieuwe behandelstrategieën te ontwikkelen met conventionele (**hoofdstuk 4 en 5**) én nieuwe (**hoofdstuk 6 en 7**) potentiële medicijnen, gebruikmakend van een techniek waarmee je tumorgroei direct en gevoelig kunt meten (**hoofdstuk 3-7**).

Ondanks dat in de kliniek verscheidene prognostische factoren worden gebruikt om het verloop van borst- en prostaatkanker te voorspellen, is het ziekteverloop nog heel divers. Beter prognostische factoren zijn dan ook hard nodig om een beter passende behandeling te kunnen aanbieden aan deze patiënten.

In **hoofdstuk 2** werd beschreven dat met een histologische "periodic acid-Schiff" (PAS)-kleuring in borstkanker naast aankleuring van de basaalmembraan van tumorbloedvaten ook andere structuren worden aangekleurd. De complexiteit van deze dunne PAS-positieve (PAS+) structuren bleek geassocieerd met een slechte prognose voor de patiënt. Bovendien waren de aanwezigheid van de meest complexe structuur, een PAS+ netwerk, in lymfekliermetastasen en de classificatie van het stadium van de kwaadaardige tumor ('staging') de enige twee onafhankelijke risicofactoren voor de vorming van een metastase op afstand. De aanwezigheid van een PAS+ netwerk in een lymfekliermetastase bleek zelfs de sterkste indicatie voor een slechte prognose. De waarneming van een PAS+ netwerk in een lymfekliermetastase zou in de kliniek dus kunnen worden gebruikt om het ziekteverloop van een heterogene groep borstkankerpatiënten beter te kunnen voorspellen, zodat de behandeling daarop aangepast kan worden.

Diermodellen zijn van essentieel belang bij zowel het ontrafelen van moleculaire mechanismen betrokken bij botmetastasering als bij het preklinisch testen van nieuwe behandelingen gericht tegen de vorming en verdere groei van botmetastasen. Het meest bekende model dat gebruik wordt voor botmetastasering is de injectie van MDA-MB-231 borstkankercellen



in het linker hartventrikel van naakte imuundeficiënte muizen. Deze tumorcellen metastaseren via de bloedbaan naar bot, waar ze botafbrekende cellen ('osteoclasten') stimuleren tot botafbraak ('osteolyse'). De tumor-geïnduceerde osteolytische plekken zijn dan na drie á vier weken te meten met behulp van röntgenapparatuur. Deze vorm van detectie is echter een indirecte en relatief onnauwkeurig methode om botmetastasen te meten. Een nieuwe techniek, bioluminescentie, werd beschreven in **hoofdstuk 3**. Deze techniek maakt gebruik van het *luciferase*-gen, dat wanneer het in de tumorcellen is gezet het enzym luciferase maakt. Na toediening van het substraat luciferine oxideert dit enzym de luciferine, waarbij er licht vrijkomt in de tumorcellen. Vervolgens kunnen deze lichtgevendende tumorcellen in een diermodel met een lichtgevoelige CCD camera worden gevolgd en gemeten. In vergelijking met detectie met behulp van röntgenapparatuur kan met bioluminescentie botmetastasen in een eerder stadium gedetecteerd worden, vaak al na 2 weken. In de volgende hoofdstukken (**4-7**) werd bioluminescentie gebruikt als techniek om tumorgroei nauwkeuriger te meten.

Bisfosfonaten zijn botresorptieremmers die in de kliniek worden gegeven als behandeling tegen tumor-geïnduceerde botafbraak. Tijdens botafbraak komen veel groeifactoren zoals transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) vrij, die mogelijk kunnen bijdrage aan tumorgroei. In **hoofdstuk 4 en 5** werd onderzocht of botresorptieremming naast remming van tumor-geïnduceerde botafbraak ook de groei en ontwikkeling van borstkanker in het bot kon remmen. In **hoofdstuk 4** werd beschreven dat een preventieve behandeling met klinisch relevante doseringen van bisfosfonaten de vorming van botmetastasen remde. Ondanks een grote remming van tumor-geïnduceerde botafbraak, kon een behandeling met bisfosfonaten nadat botmetastasen al ontwikkeld waren de tumorgroei niet meer remmen (curatieve behandeling).

Het is echter niet uit te sluiten dat een potenter of hogere dosering van een bisfosfonaat, of een botresorptieremmer met een ander werkingsmechanisme verdere groei van borstkanker in de bot wel zou kunnen remmen. Daarom hebben we in een model van borstkankergroei in de tibia (scheenbeen) in **hoofdstuk 5** zowel de effecten bestudeerd van een hoge dosering zoledronine zuur (Zometa®), het nu meest krachtige bisfosfonaat beschikbaar, als het effect van osteoprotegerine, dat botresorptie via een ander mechanisme remt. Zoals verwacht remden behandeling met zoledronine zuur of osteoprotegerine de vorming van tumor-geïnduceerde osteolytische plekken en voorkwamen ze de afbraak van bottrabekels, die in het bot onder andere voor extra stevigheid zorgen. De hoeveelheid tumor binnen-bot was na behandeling met zoledronine zuur of osteoprotegerine minder groot, echter een gedeelte van de tumor groeide buiten-bot en deze hoeveelheid tumor was even groot in vergelijking met de controlebehandeling. De totale tumor grootte (binnen-bot + buiten-bot) leek bij de behandelde groepen iets minder groot, maar gaf geen significant verschil in vergelijking met de controlebehandeling. De data beschreven in dit proefschrift wijzen er op dat de initiële tumorgroei in

het bot afhankelijk is van de interacties met het botmilieu, maar dat tijdens verdere progressie de tumorgroei steeds onafhankelijker wordt van het botmilieu.

Zoals de meeste kankers ontstaan borst- en prostaatkanker uit epitheelcellen: cellen met een duidelijke onder- en bovenkant, die de eigenschap hebben dat ze aan elkaar vastzitten en die het oppervlak bekleden van onder andere huid, slijmvliezen, luchtwegen, maag-darmkanaal, en borst- en prostaatklieren. De ondergrond van een laag epitheel bestaat uit bindweefsel, ook wel mesenchym genoemd. Echter, tijdens het ontstaan en de groei van kanker ('carcinogenese') kunnen tumorcellen bepaalde epitheliale eigenschappen verliezen. Kwaadaardige tumorcellen aan de rand van de primaire tumor kunnen doordat ze niet meer goed aan elkaar hechten, losraken van de primaire tumor, binnendringen in het omliggende gezonde (bind)weefsel en uiteindelijk uitzaaïen naar andere organen. De kanker is dan invasief geworden. Het verkrijgen van een invasief fenotype lijkt veel op een epitheliale-mesenchymale transitie (EMT), een proces dat van essentieel belang is tijdens de embryonale ontwikkeling van verscheidene organen zoals de nier. TGF- $\beta$  (transformerende groeifactor-beta) is een van de belangrijkste factoren die via intracellulaire Smad eiwitten EMT kan stimuleren in verschillende processen zoals bij wondgenezing, embryogenese en carcinogenese. BMP7 (bot morfogenese proteïne-7) kan daarentegen EMT remmen en het tegenovergestelde proces, een mesenchymale-epitheliale transitie (MET), induceren in nierepitheelcellen.

In **Hoofdstuk 6 en 7** werd de hypothese getest of BMP7 ook MET kon induceren in borst- en prostaatkanker. De hoeveelheid BMP7-eiwit ('de expressie') in borst- en prostaatkanker-cellijnen was gecorreleerd met de expressie van de epitheliale factor E-cadherine, en omgekeerd evenredig gecorreleerd met de mesenchymale marker vimentine, en de mate van kwaadaardigheid. BMP7 remde TGF- $\beta$  geïnduceerde EMT en stimuleerde MET in borst- en prostaatkanker-cellijnen. In klinische monsters van prostaatkankerpatiënten was BMP7 expressie verlaagd in tumorcellen ten opzichte van gezonde prostaatcellen. Bij borstkankerpatiënten was verlaagde BMP7 mRNA expressie in de primaire tumor bovendien gecorreleerd met de vorming van nieuwe botmetastasen. Wanneer BMP7 tot overexpressie werd gebracht in een borstkanker-cel lijn, waardoor er meer BMP7 eiwit werd aangemaakt, remde dit het ontstaan van het aantal tumor-geïnduceerde osteolytische plekken. Groei van borstkanker in de borst en in het bot werd bovendien geremd door dagelijkse behandeling met BMP7. Behandeling met BMP7 bleek tevens de groei van prostaatkanker in het bot, maar niet in de prostaat te remmen. De omgeving van de tumor bepaalt dus mede de therapeutische respons van BMP7 op prostaatkanker.

De data beschreven in **hoofdstuk 6 en 7** suggereren dat er een belangrijke rol voor BMP7 is weggelegd in het behoud van epitheliale homeostase in de gezonde borst en prostaat. Hier stimuleert BMP7 de expressie van epitheliale eiwitten zoals E-cadherine, remt het

de synthese van het mesenchymale eiwit vimentine, en voorkomt het EMT. Tijdens tumorprogressie kan verlies van BMP7 expressie mogelijk leiden tot verlies van E-cadherine en leiden tot EMT en metastasering. In de prostaat zou in aanwezigheid van BMP7, TGF- $\beta$  zelfs kunnen bijdrage aan de epitheliale homeostase.

In dit proefschrift zijn verschillende processen beschreven die betrokken zijn bij metastasering, in het bijzonder botmetastasering. De aanwezigheid van PAS+ netwerken in lymfekliermetastasen van borstkanker is een prognostische factor voor de ontwikkeling van metastasen op afstand, en lage BMP7 mRNA expressie in primair borstkanker is een goede indicator voor de ontwikkeling van botmetastasen. Deze factoren kunnen worden gebruikt om te bepalen welke patiënten een verhoogd risico hebben op metastasering, zodat sneller en adequater met bv. een bisfosfonaatbehandeling gestart kan worden.

Op basis van de bevindingen beschreven in dit proefschrift en in de literatuur stellen wij een model voor waarbij tumorcellen van borst- en prostaatkanker via de bloedbaan door heel het lichaam verspreid worden met een voorkeur om naar bepaalde organen, zoals bot, uit te zaaien. Van de uitgezaaide tumorcellen kunnen alleen die cellen met bepaalde stamceileigenschappen, zoals de mogelijkheid tot oneindig delen, in staat zijn uiteindelijk uit te groeien tot een macrometastase. Tumorcellen kunnen in het bot jarenlang in ruste zijn en pas bij een locale hoge concentratie van groeifactoren van bv. TGF- $\beta$  en IGF, veroorzaakt door een normale botresorptie unit ('basic multicellular unit', BMU), worden gestimuleerd tot groei en vorming van een macrometastase. Behandelstrategieën die erop gericht zijn het aantal botresorptie units te verminderen, zoals bisfosfonaten en osteoprotegerine, zouden dus de vorming van nieuwe botmetastasen kunnen remmen. Dit geldt ook voor behandelingen die de pro-tumorigene effecten van TGF- $\beta$  kunnen remmen, zoals BMP7. BMP7 zou bovendien kunnen zorgen voor epitheliale homeostase in de borst en prostaat, waardoor dit een goede nieuwe behandeling kan worden in strijd tegen borst- en prostaatkanker.

## List of Abbreviations

ActRII	activin type II receptor
ActRIIB	activin type IIB receptor
ALK	activin receptor-like kinase
AMHRII	Anti-Müllerian hormone type II receptor
bFGF	basic fibroblast growth factor
BLI	bioluminescent imaging
BMP	bone morphogenetic protein
BMPRI	BMP type I receptor
BMPRII	BMP type II receptor
BM	bone marrow
BMU	basic multicellular unit
BP	bisphosphonate
BRE	BMP-responsive element
BSP	bone sialoprotein
CDKI	cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI)
CMV	cytomegalovirus
CSC	cancer stem cell
CT	connective tissue
DFS	disease free survival
DKK-1	dickkopf
DTC	disseminating tumor cell
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
ER	estrogen receptor
ERK	extracellular signal-related kinase
ET-1	endothelin-1
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
GFP	green fluorescent protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor (alias CSF2)
HGF	hepatocyte growth factor (alias scatter factor)
Hh	hedgehog
HRPC	hormone refractory prostate cancer
HSC	hematopoietic stem cell
i.c.	intracardiac
i.m.	intramuscle
i.o.	intraosseous
i.v.	intravenous
IBC	inflammatory breast cancer
Id	Inhibitor of DNA binding
IDC	invasive ductal carcinoma
IGF	insulin growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
IHC	immunohistochemistry
IL	interleukin
ILC	invasive lobular carcinoma
JNK	JunN-terminal kinase
LAP	latency-associated peptide
LCM	laser capture microdissection
LLC	large latent complex
LSD	least significant difference
LTBP	large latent TGF- $\beta$ -binding protein
Luc	luciferase

M-CSF	macrophage colony stimulating factor (alias CSF1)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MET	mesenchymal-to-epithelial transition
MIC	metastasis-initiating cell
MRD	minimal residual disease
MSC (cell)	migrating cancer stem (cell)
n.s.	not significant
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
OPG	osteoprotegerin
OPN	osteopontin
PAS	periodic acid-Schiff
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PR	progesteron receptor
PSA	prostate-specific antigen
PTH	parathyroid hormone
PTHrP	parathyroid hormone-related protein
qPCR	quantitative real-time reverse transcription PCR
R-Smads	receptor-regulated Smads
RANK	receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B
RANKL	receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B ligand
RLU	relative light unit
Runx2	runt-related transcription factor 2 (alias core-binding factor $\alpha$ 1)
s.c.	subcutaneous
s.e.m.	standard error of the mean SBE smad-binding element
SCID	severely compromised immunodeficient
SCS (cell)	stationary cancer stem (cell)
SDF-1	stromal derived growth factor-1
SLC	small latent complex
SMA	smooth muscle actin
Smad	Sma-Mad related proteins
Smurf	Smad ubiquitin regulatory factor
SNO (cells)	spindle-shaped N-cadherin+ CD45- osteoblastic (cells)
SRE	skeletal-related events
sALP	serum alkaline phosphatase
TBR11	transforming growth factor- $\beta$ type II receptor
TBV	trabecular bone volume
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TGIF	TGF- $\beta$ -induced factor
TMA	tissue microarray
TNF	tumor necrosis factor
Tob	transducer of ErbB-2
TRAcP	tartrate-resistant acid phosphatase
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VM	vasculogenic mimicry
vWF	von Willebrandt Factor
Wnt	wingless int
ZO	zona occludens
ZOL	zoledronic acid

## List of publications

1. **Buijs JT**, van der Pluijm G. Osteotropic cancers: From primary tumor to bone. Review. *Cancer Letters* 2008. *in press*.
2. **Buijs JT**, Que I, Löwik CWGM, Papapoulos SE, van der Pluijm G. Inhibition of bone resorption and growth of breast cancer in the bone microenvironment. *Bone*, 2008, *in press*.
3. Kaijzel EL, Snoeks TJ, **Buijs JT**, van der Pluijm G, Löwik CWGM. Multimodal imaging and treatment of bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2008, *in press*.
4. Notting IC, **Buijs JT**, Speetjens FM, Mintardjo RE, Henriquez NV, Schalijs-Delfos NE, Keunen JEE, van der Pluijm G. Expression of tumor-suppressor gene DAN in uveal melanoma: a new prognostic marker? *submitted for publication*.
5. **Buijs JT**, Henriquez NV, van Overveld PG, van der Horst G, Ten Dijke P, van der Pluijm G. TGF- $\beta$  and BMP7 interactions in tumour progression and bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24:609-17.
6. **Buijs JT**, Henriquez NV, van Overveld PG, van der Horst G, Que I, Schwaninger R, Rentsch C, Ten Dijke P, Cleton-Jansen AM, Driouch K, Lidereau R, Bachelier R, Vukicevic S, Clézardin P, Papapoulos SE, Cecchini MG, Löwik CW, van der Pluijm G. Bone Morphogenetic Protein 7 in the Development and Treatment of Bone Metastases from Breast Cancer. *Cancer Res* 2007; 67:8742-51.
7. **Buijs JT**, Rentsch CA, van der Horst G, van Overveld PG, Wetterwald A, Schwaninger R, Henriquez NV, Ten Dijke P, Borovecki F, Markwalder R, Thalmann GN, Papapoulos SE, Pelger RC, Vukicevic S, Cecchini MG, Löwik CWGM, van der Pluijm G. BMP7, a Putative Regulator of Epithelial Homeostasis in the Human Prostate, is a Potent Inhibitor of Prostate Cancer Bone Metastasis In Vivo. *Am J Pathol* 2007; 171:1047-57.
8. Henriquez NV, van Overveld PG, Que I, **Buijs JT**, van der Horst G, Bachelier R, Kaijzel EL, Löwik CWGM, Clezardin P, van der Pluijm G. Advances in optical imaging and novel model systems for cancer metastasis research *Clin Exp Metastasis* 2007; 24:699-705.
9. Notting IC, **Buijs JT**, Mintardjo R, van der Horst G, Vukicevic S, Löwik CWGM, Schalijs-Delfos N, Keunen J, van der Pluijm G. Bone Morphogenetic Protein 7 inhibits tumor growth of uveal melanoma *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 48:4882-9.
10. Deckers M, van Dinther M, **Buijs JT**, Que I, Löwik CWGM, van der Pluijm G, ten Dijke P. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66:2202-9.
11. Notting IC, **Buijs JT**, Que I, Mintardjo RE, van der Horst G, Karperien M, Missotten GS, Jager MJ, Schalijs-Delfos NE, Keunen JE, van der Pluijm G. Whole-body bioluminescent imaging of human uveal melanoma in a new mouse model of local tumor growth and metastasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46:1581-7.
12. van der Pluijm G, **Buijs JT**. Angiogenesis and lymphangiogenesis in metastatic bone disease: a matter of networking. In: Singh G, Orr W (eds.) *Bone Metastasis and Molecular Pathophysiology* volume 6:139-62. Kluwer Academic Publishers 2004.
13. **Buijs JT**, Cleton A-M, Smit VTHBM, Löwik CWGM, Papapoulos SE, van der Pluijm G. Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary breast cancer and its lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat*. 2004; 84:117-30.
14. Wetterwald A, van der Pluijm G, Que I, Sijmons B, **Buijs JT**, Karperien M, Lowik CWGM, Gautschi E, Thalmann GN, Cecchini MG. Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am J Pathol* 2002; 160:1143-53.
15. Van Duijn MM, **Buijs JT**, Van der Zee J, Van den Broek PJA. The ascorbate: ascorbate free radical oxidoreductase from the erythrocyte membrane is not cytochrome b561. *Protoplasma* 2001; 217:94-100.



## Curriculum Vitae

Jeroen Theodorus Buijs werd geboren op 27 januari 1979 in Amsterdam. Na het behalen van zijn VWO diploma in juni 1997 aan het Thorbecke Lyceum in Rotterdam, begon hij aan de studie Biomedische Wetenschappen aan de Universiteit Leiden. Tijdens deze studie werden stages gelopen bij de afdeling Moleculaire Celbiologie in het Sylviuslaboratorium onder leiding van Dr. M.M. van Duijn en Dr. P.J.A. van den Broek, bij de afdeling Endocrinologie en Stofwisselingsziekten van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC), onder leiding van Dr. G. van der Pluijm en Prof. Dr. C.W.G.M. Löwik, en bij de afdeling Pathologie van het LUMC, onder leiding van Dr. A.M. Cleton-Jansen. Nog tijdens de studie werd in nauwe samenwerking met de afdeling Endocrinologie en Stofwisselingsziekten een werkbezoek van drie maanden afgelegd bij de afdeling 'Gene Therapy' van het 'Inselspital' in Bern (Zwitserland) onder leiding van Dr. M.G. Cecchini. Na zijn afstuderen in September 2001, was hij werkzaam als promovendus bij de afdeling Endocrinologie en Stofwisselingsziekten van het LUMC, onder leiding van Dr. G. van der Pluijm en Prof. Dr. S.E. Papapoulos. Het hier uitgevoerde onderzoek staat beschreven in dit proefschrift, en is gehonoreerd met een prijs voor beste researchposter op het *'Vth International Conference on Cancer-Induced Bone Disease'* in Davos (Zwitserland) in 2005 en geselecteerd voor een mondelinge presentatie op de *'17th Scientific Meeting of the International Bone & Mineral Society (IBMS)'* in Montréal (Canada) in 2007. Sinds april 2006 zet hij zijn onderzoek naar processen die betrokken zijn bij metastasering naar bot voort als postdoc bij de afdeling Urologie van het LUMC op het door EU gefinancierde zesde kader programma PRIMA (FP-504587)

Jeroen Theodorus Buijs was born on 27<sup>th</sup> of January 1979 in Amsterdam. After graduation from high school in 1997 at the 'Thorbecke Lyceum' in Rotterdam, he started to study Biomedical Science at the University of Leiden. During his study he performed internships at the department of 'Molecular Cell Biology' at the Sylvius under supervision of Dr. M.M. van Duijn and Dr. P.J.A. van den Broek, at the department of 'Endocrinology and Metabolic Diseases' at the Leiden University Medical Center (LUMC) under supervision of Dr. G. van der Pluijm and Prof. Dr. C.W.G.M. Löwik, and at the department of Pathology at the LUMC under supervision of Dr. A.M. Cleton-Jansen. At the end of his study, he worked, in close collaboration with the department of 'Endocrinology and Metabolic Diseases', at the department of Gene Therapy at the 'Inselspital' in Berne (Switzerland) under supervision of Dr. M.G. Cecchini. After graduation in September 2001, he started his PhD research at the department of 'Endocrinology and Metabolic Diseases' under supervision Dr. G. van der Pluijm and Prof. Dr. S.E. Papapoulos. The work from this period is described in this thesis, and was awarded with the prize for best research poster at the *Vth International Conference on Cancer-Induced Bone Disease* in Davos (Switzerland) in 2005, and selected for oral presentation at the *'17th Scientific Meeting of the International Bone & Mineral Society (IBMS)'* in Montréal (Canada) in



2007. Since April 2006 he works as a postdoctoral researcher at the department of Urology at het LUMC on an EU-financed sixth framework program PRIMA (FP-504587), studying the pathogenesis and treatment of bone metastasis.