



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Identification of novel targets in prostate cancer progression

Ghotra, V.P.S.

Citation

Ghotra, V. P. S. (2013, December 19). *Identification of novel targets in prostate cancer progression*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22947>

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/1887/22947>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22947> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Ghotra, Veerander Paul Singh

Title: Identification of novel targets in prostate cancer progression

Issue Date: 2013-12-19

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Metastasering is een complex biologisch proces, dat stapsgewijs geanalyseerd moet worden met behulp van de huidige technologie. We hebben besloten om onze studies te richten op androgeen-onafhankelijke (AI) prostaatkanker, die over het algemeen zeer agressief is. Een betrouwbaar en goed gekarakteriseerd modelsysteem van prostaatkanker progressie is van groot belang om een behandeling voor de androgeen-onafhankelijk staat te ontwikkelen. Om effectief nieuwe geneesmiddelen te maken, is het nodig om betrouwbare modellen op te schalen voor medium of high throughput screening (HTS). Gezien de technische uitdagingen zijn er weinig modellen die de mogelijkheid voor HTS ondersteunen.

Om deze uitdaging aan te gaan, hebben wij gewerkt aan het ontwikkelen van nieuwe modellen die de belangrijkste stappen in de progressie van kanker recapituleren. We hebben 3D sferoïde en een xenograft-model ontwikkeld om groei, invasie en disseminatie van kanker cellen te bestuderen. Eerst hebben wij een 3D collageen matrix sferoïde assay van groei en invasie ontwikkeld (*hoofdstuk 2*). Deze test recapituleert de stappen van groei en invasie van tumoren op de primaire of metastatische sites. Collageen type 1 is een van de belangrijkste extracellulaire matrix (ECM) eiwitten in het bot, en is een ideale omgeving om de groei en invasie kenmerken van de androgeen-onafhankelijke metastaserende prostaatkanker te bestuderen. Dit model hebben wij toegepast in 96 wells platen waardoor het toepasbaar is voor high throughput screening. Vervolgens is dit model toegepast voor celsuspensies verkregen uit resectiepreparaten. Het laatste opent de mogelijkheid om therapeutische strategieën op vers geïsoleerd materiaal van individuele patiënten te testen. Tot zover werden sarcoom bipten gebruikt, het is nog onbekend of deze ook succesvol zijn voor carcinomen, waaronder prostaatkanker. Voor de toekomst zouden wij graag deze assay willen uitbreiden/toepassen om complexe interacties tussen tumorcellen en stromale cellen te bestuderen, bijvoorbeeld door injectie van combinaties van kanker-, endotheel, fibroblastcellen. Dit zou ons nieuwe informatie kunnen opleveren over het proces van tumor geïnduceerde neo-angiogenese of vasculogenese, dit kan vervolgens weer van belang zijn voor de ontwikkeling van nieuwe anti-angiogene therapieën tegen kanker. Wij hebben vooral gebruik gemaakt van PC3 cellen om prostaatkanker invasie in het in-vitro model te bestuderen. Een grote uitdaging zal zijn om de kweekomstandigheden zodanig aan te passen dat ook minder agressieve prostaatkanker cellijnen kunnen worden bestudeerd in hetzelfde systeem, bijvoorbeeld door wijziging van de ECM omgeving.

Ten tweede, richten wij onze aandacht op de zebravis. Deze blijkt een goed diermodel te zijn om de ontwikkeling van tumoren, de invasie, en de dynamiek van de metastaseringscascade te bestuderen. Verschillende onderzoeksgroepen hebben succesvol xenotransplantatie van menselijke kankercellen van verschillende oorsprongen in de zebravis uitgevoerd om deze processen te bestuderen zoals invasie; tumor geïn-

duceerde angiogenese, experimentele metastasering en de respons op anti-kanker therapieën. Het kleine formaat, transparantie en de beschikbaarheid van verschillende transgene zebravis fluorescerende lijnen hebben geleid tot koppeling van dit model aan geautomatiseerde confocale beeldvorming en beeldanalyse (*hoofdstuk 3*). Tot zo ver bekend, is dit de eerste semiautomatische bio-imaging assay gebaseerd op het hele organisme dat de analyse van de disseminatie van kankercellen in een high throughput manier mogelijk maakt. De volgende stap is de ontwikkeling van geautomatiseerde injectie van de cellen in het embryo zodat het een volledig geautomatiseerd systeem wordt. Door de voortdurende ontwikkeling op het gebied van imaging technologie en de beschikbaarheid van nieuwe transgene zebravis lijnen, zal het ook zeer interessant zijn om onze test te gebruiken voor kankercellijnen waarin combinaties van fluorescente markers worden gebruikt in kwantificering van apoptose, proliferatie en disseminatie. In onze assay kunnen ook specifieke transgene zebravis lijnen gebruikt worden die fluorescent gelabelde immuuncellen of andere celtypen bevatten. Dit zal ons waardevolle informatie over de tumorcel en de micro-omgeving interacties opleveren. Er zijn enkele belangrijke openstaande vragen over het gebruik van de zebravis: wat is de voorspelbaarheid van het model voor gedrag in zoogdiermodellen; in welke mate correleren de effecten met de effecten in de mens; wat is de voorspelbaarheid van de zebravis met betrekking tot de PK - PD (Farmacokinetiek - Farmacodynamiek) relaties? Deze vragen moeten dringend worden beantwoordt om de inzetbaarheid van dit geautomatiseerde in vivo model in de geneesmiddelenindustrie te realiseren.

In *hoofdstuk 5*, is het zebravis xenotransplantatie model toegepast op een panel van agressieve (AI) en minder agressieve (androgeen afhankelijk; AD) prostaatkanker cellijnen. AI cellen toonden meer verspreiding in zebravis embryo's ten opzichte van AD cellen (LNCaP). Onze bevindingen tonen aan dat deze assay correleert met de resultaten van duurdere en low throughput assays zoals muismodellen. Op basis van deze gegevens, kunnen wij concluderen dat zebravis embryo's een passende omgeving leveren voor de succesvolle implantatie, proliferatie en verspreiding van AI cellijnen. Daarom representeert deze test een ideaal platform voor het screenen van genen die zijn betrokken bij de invasie en disseminatie van AI prostaatkanker met behulp van RNA interferentie. Huidige behandelingsopties voor prostaatkanker zijn vaak niet succesvol en in *hoofdstuk 4* bespreken we een aantal huidige strategieën voor verbetering. Echter, er is duidelijk behoefte aan nieuwe drug targets om de mogelijkheden voor behandeling te verruimen.

De ontwikkelde experimentele modellen zijn dan ook gebruikt om de volgende vragen te beantwoorden :

- Kunnen wij onze modellen gebruiken om kritische targets te identificeren en valideren die betrokken zijn bij prostaatkanker metastasering?
- Kunnen we deze targets valideren in andere modellen?
- Zijn deze targets relevant voor de menselijke situatie?

Om deze vragen te beantwoorden hebben wij een adenovirale RNAi screen uitgevoerd in het zebravis xenotransplantatie model om nieuwe targets voor prostaatkanker progressie te identificeren en valideren (*hoofdstuk 5*). Op basis van deze screen hebben wij het SYK kinase geïdentificeerd die betrokken is bij disseminatie van de AI prostaatkankercellen. In lijn met de zebravis en 3D modellen leidt downregulatie van SYK ook tot een sterke vermindering van metastatische kolonisatie in een preklinisch muismodel voor prostaatkanker bot metastasering. Dit model heeft belemmeringen zoals een gecompliceerd immuunsys-

teem, mogelijke effecten van muis-humaan combinatie, en het onvermogen om de eerste stappen van tumorgroei, invasie, en disseminatie te bestuderen. Het gebruik van genetisch gemanipuleerde modellen (GEM) die de progressie van prostaatkanker recapituleert biedt de mogelijkheid voor verdere validatie van de kandidaat- targetgenen geïdentificeerd in onze screen. De volgende stap is bijvoorbeeld om de rol van SYK in prostaatkanker progressie te bestuderen door het SYK gen uit te schakelen in het TRAMP model dat de pathofysiologische kenmerken bij het vorderen van prostaatkanker in de mens recapituleert. De betrokkenheid van SYK is al aangetoond bij lymfoïde maligniteiten en lijkt tegengestelde rollen te spelen in verschillende solide tumoren. Tot zover bekend is, is SYK niet eerder verbonden aan prostaatkanker.

Het effect van SYK depletie op bekende downstream targets als PI3K of AKT activiteit moet worden bepaald. Maar uit onze bevindingen blijkt wel al dat SYK kinase activiteit de prostaatkanker invasie, disseminatie en metastatische kolonisatie ondersteunt: Het effect van SYK downregulatie op metastatische kolonisatie wordt teniet gedaan door expressie van wild type SYK maar niet door een “kinase-dode” mutant. Inderdaad, recapituleert farmacologische remming van SYK activiteit met R-406 en BAY-61-3606 het effect van de SYK downregulatie in vitro en in het zebrafish xenotransplantatie model. Het zal belangrijk zijn om het effect van farmacologische remming van SYK activiteit ook te bestuderen in het muismodel zoals gebruikt door ons en de andere bovengenoemde preklinische muismodellen. Verder hebben wij ook gevonden dat SYK de oppervlakte-expressie van adhesie receptoren, zoals CD44 en $\alpha\beta1$ integrine reguleert op het post translationele niveau. Dit zou een mogelijk onderliggende mechanisme zijn voor de rol van SYK in de disseminatie van prostaatkanker. siRNA downregulatie van het integrine of CD44 leidt eveneens tot verminderde invasie of tot kolonisatie. Het is eerder aangetoond in andere celtypen dat SYK het transport en stabilisatie van adhesie receptoren door ITAM - gemedieerde SYK en AKT activatie- reguleert. Toekomstige experimenten moeten verder het mechanisme van de werking van SYK ontrafelen. SYK fungeert in prostaatkanker mogelijk als een oncogen, net als bij verschillende andere maligniteiten zoals lymfomen, chronische leukemie en maagkanker. In tegenstelling lijkt SYK op een tumor suppressor in borstkanker, waar downregulatie van SYK is gecorreleerd met groei en invasie. Belangrijk zou kunnen zijn dat het SYK gen alternatieve splicing ondergaat. De meeste studies hebben geen onderscheid gemaakt tussen globale en splice-specifieke SYK expressie. Het is mogelijk dat differentiële expressie van SYK(L) en SYK(S) de zo verschillende functies in verschillende vormen van kanker verklaart. Het zal belangrijk zijn om onze eigen studies uit te breiden met de identificatie van de SYK isovormen.

Een ander gen dat wij hebben geïdentificeerd in onze screen is MST1R. Deze MET- gerelateerde receptor tyrosine kinase is al eerder aangetoond voor betrokkenheid bij groei en tumor geïnduceerd angiogenese bij prostaatkanker. De functie van MST1R in groei van prostaat tumor kan onder andere ondersteunt worden door MST1R in kanker - geassocieerde macrofagen. Twee studies laten zien dat deze receptor ook een rol speelt in de prostaatkankercellen. In *hoofdstuk 6* laten wij zien dat downregulatie van MST1R leidt tot een fenotype dat ook wordt waargenomen wanneer MET (de receptor voor HGF) down gereguleerd wordt in verschillende typen kankercellen. Cellen lijken minder verspreid en vormen epitheliale eilanden. Deze rol voor MST1R in invasie en migratie van prostaatkanker cellen is nieuw. Naast migratie in 3D collageen matrix bevordert MST1R de disseminatie van prostaatkanker cellen in het zebrafish embryo xenotransplantatie model en in de muis xenograft. Fundamenteel, translationeel en klinisch onderzoek heeft het belang van

MET aangetoond bij prostaatkanker progressie. MET komt verhoogd voor bij primaire prostaatkanker, en de MET expressie wordt verder verhoogd in bot metastasen en wordt geassocieerd met de ontwikkeling van castratie resistente prostaatkanker. Vanwege het therapeutische belang, werden MET remmers al gebruikt in klinische studies voor behandeling van geavanceerde castratie-resistente prostaatkanker. Een robuuste pijplijn van MET inhibitoren gericht op verschillende aspecten van de MET activering wordt al onderzocht in fase II en fase III klinische studies. Het bekendste voorbeeld is de ARQ-197, dat reeds de late fase van klinische ontwikkeling in verschillende tumoren heeft bereikt, waaronder prostaatkanker. Overigens bevatte de in hoofdstuk 5 beschreven screen twee MET shRNAs. Die vertoonden geen significant effect op de disseminatie van de PC3 cellen. Aangezien het niveau van knockdown niet is geanalyseerd in de screen kunnen we over de “non-hits” geen uitspraak doen en betekent dit zeker niet dat een rol voor MET is uitgesloten in de disseminatie van de PC3 cellen in dit model. In feite zou gebaseerd op de literatuur, effectieve stabiele knockdown van MET een hetzelfde effect moeten hebben op disseminatie van prostaatkanker cellen als de MST1R knockdown. Er is ook bewijs voor een functionele interactie tussen MET en MST1R. Ons onderzoek wijst er tot dusver niet op dat MST1R downregulatie een effect op MET signalering heeft maar in het licht van de beschreven cross-fosforylatie zou dit zou verder onderzocht kunnen worden. Belangrijk is dat MST1R, net als SYK, wordt bevestigd in het muismodel. Bovendien laten AI lijnen een hogere expressie zien van MST1R. Zoals hierboven genoemd voor SYK, zullen verdere studies in de verschillende prostaatkanker muismodellen van belang zijn om MST1R te betrekken bij prostaatkanker progressie. Onze huidige studie waarin MST1R in migratie, invasie van prostaatkanker cellen wordt geïmpliceerd is een eerste stap in deze richting.

Tot slot hebben de resultaten van dit proefschrift bijgedragen aan ons algemeen begrip van het probleem van prostaatkanker metastase. We hebben nieuwe op fluorescentie bio-imaging gebaseerde geautomatiseerde modellen ontwikkeld om te detecteren welke kandidaat genen betrokken zijn bij prostaatkanker metastasering. Gebruikmakend van deze modellen konden we SYK en MST1R identificeren als nieuwe regulatoren van prostaatkanker progressie. Voor beide potentiële drug-targets hebben we een eerste stap gezet voor validatie in humane prostaatkanker. Hoewel dit sterk moet worden uitgebreid en verder onderzoek nodig is naar hun werkingsmechanisme en regulatie van RNA expressie/ splicing/ eiwit niveaus, zijn de resultaten bemoedigend dat het mogelijk targets zijn met klinische relevantie.