



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The bone morphogenetic protein pathway in colorectal cancer progression

Voorneveld, P.W.

Citation

Voorneveld, P. W. (2020, September 24). *The bone morphogenetic protein pathway in colorectal cancer progression*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136915>

Version: 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/1887/136915>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136915> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Voorneveld, P.W.

Title: The bone morphogenetic protein pathway in colorectal cancer progression

Issue Date: 2020-09-24

Nederlandse samenvatting

Van een goede balans naar kanker

De darm is een groot orgaan en bestaat uit de dunne darm en de dikke darm. De dunne darm is ongeveer 6-7 meter lang en is onder andere belangrijk voor het verteren en opnemen van voedsel. Om dit mogelijk te maken bestaat de dunne darm uit allerlei vouwen om het oppervlak te vergroten. Daarnaast is de binnenkant bekleed met villi, een soort vingerachtige uitsteeksels, waardoor het totale contactoppervlak tussen de 150-200 m² ligt. De dikke darm (colon) heeft deze villi niet en is voornamelijk verantwoordelijk voor absorptie van water. De binnenbekleding van de darm, ook wel intestinaal epitheel genoemd, vernieuwt zich in een rap tempo. Zoals eerdergenoemd bestaat het intestinaal epitheel in de dunne darm uit villi. Tussen de villi zitten crypten; dit zijn een soort kommetjes waar stamcellen in zitten. Deze stamcellen delen zich en de nieuwe cellen worden omhooggeduwd naar de transit amplifying zone. Dit is een zone onderaan de villi waar veel celdelingen plaatsvinden. De nieuwe cellen gaan omhoog langs de villi en zullen uiteindelijk in apoptose (geprogrammeerde celdood) gaan zodra ze op de top van de villi zijn. Dit is een continu proces wat zorgt voor snelle vernieuwing van het hele epitheel. De reis van een nieuwe cel in de crypt tot aan apoptose boven aan de villi duurt ongeveer 5 dagen. Het colon heeft geen villi, maar het principe van een stamcelcompartiment onderin de crypt waar nieuwe cellen ontstaan met migratie naar boven is hetzelfde.

Stamcellen kunnen in principe worden wat ze willen. Maar hoe weet een cel dat het een stamcel moet blijven, of dat het een ander soort cel, een gedifferentieerde cel, moet worden? Hoe weten de cellen of ze onderin de crypt moeten blijven of moeten migreren naar boven? En hoe weten de cellen dat ze bovenin het programma 'celdood' aan moeten zetten, afscheid moeten nemen van het darmepitheel en zo uiteindelijk in de ontlasting terecht komen? We weten nog lang niet alles van dit proces, en we zullen hier nog veel ontdekkingen doen de komende jaren, maar we hebben een basaal inzicht in het systeem. Cellen staan onder invloed van signaaltransductie paden. Deze signaaltransductie paden kunnen allerlei effecten hebben; bijvoorbeeld verandering in een ander type cel (differentiatie), celdeling (proliferatie), verplaatsing van de cel (migratie) en celdood (apoptose). Dit gebeurt via morphogenen. Een morphogen is een signaal molecuul wat ergens door een bron geproduceerd wordt en vervolgens door het omgevende weefsel diffundeert. Op deze manier ontstaat er een gradiënt, waarbij de concentratie dicht bij de bron

hoog is en langzaam afneemt naar mate de afstand tot de bron groter wordt. Op basis van de concentratie zijn er bepaalde drempels waardoor er een effect op de cel optreedt.

Signaaltransductie is een methode van het lichaam om een heleboel systemen in het lichaam te regelen. Zo ‘weten’ je botten bijvoorbeeld wanneer ze moeten stoppen met groeien. Er zijn veel verschillende signaaltransductie paden, maar voor deze thesis wil ik er twee uitlichten. Dit zijn het WNT-signaal pad en het BMP (Bot Morfogenetisch Proteïne) signaal pad. WNT-signalering is actief onderin de crypt en zorgt voor celdeling. Daarnaast zorgt WNT ervoor dat de stamcellen niet differentiëren en gewoon stamcellen blijven. De nieuwe cellen gaan vervolgens omhoog en komen onder invloed van het BMP-signaal pad. BMP zorgt eerst voor differentiatie en later, als de cellen bovenaan de villus zijn, voor apoptose. De WNT en BMP-signaalpaden zijn in balans en hebben invloed op elkaar. Zo zorgt WNT-signalering voor onderdrukking van BMP, en BMP zorgt voor onderdrukking van WNT. Zolang deze twee signaal paden in balans (homeostase) zijn, is er geen probleem, maar het is goed voor te stellen dat als BMP ineens niet meer goed werkt, de cellen niet meer doodgaan en zich ophopen. Hetzelfde geldt voor WNT; als deze signalering te hard werkt ontstaan er te veel nieuwe cellen. Op deze manier kan er uiteindelijk kanker ontstaan. Er kunnen op allerlei niveaus fouten ontstaan in dit systeem. Zo kan het onder andere misgaan in de productie van de morphogenen, de ontvangers van de signalen (receptoren) en het signaaltransductie pad in de cel. Het signaaltransductie pad in de cel is een cascade van eiwitten die het signaal doorgeven vanaf de ontvangst (receptor) tot aan het DNA, alwaar vervolgens bepaalde genen tot expressie komen. Fouten in signaalpaden zijn een van de mogelijke oorzaken van kanker. In een orgaan als de darm waar het epitheel zo snel wordt vernieuwd is er sprake van een hoge mate van celdeling, en waar cellen delen worden ook fouten gemaakt. Zo kunnen fouten ontstaan in het BMP en WNT pad, maar ook in veel andere processen. Het is niet voor niets dat darmkanker een veel voorkomende ziekte is. In 2018 zijn er in Nederland ongeveer 14.100 nieuwe patiënten met dikke darmkanker gediagnosticeerd (www.volksgezondheidenzorg.info).

In deze thesis hebben we geprobeerd meer inzicht te krijgen in hoe het BMP-signaal pad werkt en wat de rol is in het ontstaan en de progressie van darmkanker. We

weten dat bepaalde erfelijke vormen van darmkanker kiembaan mutaties hebben in onderdelen van het BMP-sigtaal pad. Dit suggereert dat BMP inderdaad belangrijk is in het behoud van een normale darm.

Hoofdstuk 2: BMP-sigtaalpad in de normale darm

We hebben gekeken naar de effecten van een te hardwerkend BMP-sigtaalpad op de crypten en villi in de darm. Er was al eerder gekeken naar wat er zou gebeuren als het BMP-sigtaalpad niet meer goed werkt. In verschillende muismodellen werd BMP geïnactiveerd door bijvoorbeeld een BMP-receptor te verwijderen of door een stofje (Noggin) te introduceren dat BMP onderdrukt. Als gevolg hiervan ontstonden poliepen in de darmen van deze muizen. Poliepen zijn een soort uitstulpingen in de darm welke kunnen ontaarden in kanker. Wij deden het tegenovergestelde in een muismodel, namelijk overactivatie van BMP door middel van een constant geactiveerde BMP-receptor. Hierbij zagen we forse veranderingen in het epitheel. Het leek totaal niet meer op de bekende crypt-villus structuur. Opvallend was dat de darm zich 6 maanden later volledig had hersteld. We snappen deze effecten nog niet volledig. Direct na inductie (=activatie) zien we verlies van stamcellen; deze conclusie hebben we getrokken doordat er geen expressie meer is van OLFM4 (een stamcel marker). Het ontbreken van stamcellen zou moeten betekenen dat er geen nieuwe cellen zouden kunnen ontstaan. Vijf dagen later is OLFM4 er echter ineens weer. We hebben hiervoor verschillende theorieën. Inductie, en dus activatie van BMP, is niet in alle cellen gebeurd, waardoor een zeer klein aantal cellen gezorgd heeft voor volledige repopulatie. Dit lijkt gezien het drastische beeld onwaarschijnlijk, maar is niet onmogelijk. Een andere optie is dat sommige gedifferentieerde cellen weer stamcellen worden en zo opnieuw beginnen met het creëren van crypten en villi; ze de-differentiëren. Verder onderzoek is nodig om dit beeld te kunnen verklaren. We zijn nog aan het onderzoeken hoe we activatie van BMP kunnen gebruiken om poliepvorming tegen te gaan. Dit doen we door het overactivatiemodel te combineren met verschillende darmkanker modellen in muizen. Mogelijk dat de 'reset' die lijkt te ontstaan door BMP-activatie een gunstig effect heeft.

Hoofdstuk 3: Een alternatief BMP-sigtaalpad

Het BMP sigtaalpad wordt beschouwd als een sigtaalpad dat beschermd tegen

kanker doordat het zorgt voor differentiatie van cellen en voor apoptose. Het wordt gezien als tumor suppressor, in tegenstelling tot tumor promotors, die juist zorgen voor kanker progressie. Het BMP signaalpad wordt geactiveerd door BMPs die zich hechten aan BMP-receptoren. Vervolgens worden de BMP-receptoren geactiveerd via phosphorylatie (het binden van een fosfaatgroep). Daarna wordt het signaal doorgegeven aan SMAD 1,5,8 wat ook wordt geactiveerd door phosphorylatie. SMAD1,5,8 vormt een complex met SMAD4 en kan zo naar de celkern gaan voor transcriptie van specifieke genen. Transcriptie is het proces waarbij DNA wordt vertaald in mRNA, een tussenstap in de uiteindelijke productie van eiwitten. Het signaal pad via SMAD4 is het normale signaal pad van BMP, hetgeen we het canonical (standaard) BMP-pad of 'SMAD4 afhankelijk BMP-pad' noemen.

In 40-60% van de sporadische darmkankers wordt verlies van SMAD4 gevonden. Verlies van SMAD4 in darmkanker is geassocieerd met een slechtere overleving. Er werd gedacht dat dit kwam door het verlies van de tumor onderdrukkende functies van BMP. Wij hebben ontdekt dat bij het verlies van SMAD4, BMP switched van een tumor suppressor naar een tumor promotor. Activatie van BMP zonder SMAD4 hebben we het non-canonical BMP-pad of 'SMAD4 onafhankelijke BMP pad' genoemd. Dit SMAD4 onafhankelijke BMP-pad heeft invloed op de tumor progressie en zorgt voor toename van metastasering.

We hebben gevonden dat ROCK hierbij een belangrijke rol speelt. Het ROCK-pad heeft invloed op de opmaak van het skelet van een cel. Tevens kan ROCK het cell skelet veranderen. Door deze verandering kan een cel bijvoorbeeld bewegen. Activatie van ROCK resulteert in een toename van beweging van (kanker)cellen waardoor deze het omgevende weefsel kunnen invaseren om uiteindelijk te kunnen metastaseren. We hebben deze processen bekeken in kankercellijnen en een metastase muismodel en zien dat activatie van het SMAD4 onafhankelijke BMP-pad zorgt voor een toename van metastasen. We zien ook dat dit effect opgeheven kan worden door toevoeging van een ROCK-inhibitor (Fasudil). ROCK zou een potentieel doel voor behandeling kunnen zijn. ROCK-inhibitoren worden reeds gebruikt bij pulmonale hypertensie en cerebrale vasospasme. Als kanttekening moet vermeld worden dat ROCK-inhibitie bij één studie heeft geleid tot ontwikkelingsdefecten in muisembryo's.

We hebben ook naar de rol van het SMAD4 onafhankelijke BMP-pad in mensen gekeken. De aanwezigheid van BMP-receptoren in SMAD4 negatieve kankers

is in ons cohort van humane colorectaal kankers geassocieerd met een slechtere overleving. Als zowel BMP-receptoren negatief zijn als SMAD4, dan is de overleving gelijk aan SMAD4 positieve kankers.

Hoofdstuk 4: De β -catenine paradox

In dit hoofdstuk onderzoeken we de interactie tussen WNT en BMP-signalering. Een opvallende observatie is een verhoogd WNT-signaal aan de rand van de tumor met tegelijk een laag WNT-signaal in het centrum. Mutaties in het WNT-signaal zijn veel voorkomend in darmkanker; bijvoorbeeld door een APC of beta-catenine mutatie. Deze mutaties zijn vaak gelijk in alle tumorcellen terwijl er dus wel een verschillend niveau van activiteit is. Er zijn dus mogelijk andere factoren die de WNT-activiteit bepalen. We hebben eerst gekeken naar andere factoren in de kankercellen zelf. Hiervoor hebben we gekozen voor SMAD4 en p53. SMAD4 vanwege de eerdergenoemde interactie tussen BMP en WNT, en vanwege het vele voorkomen van SMAD4 verlies in darmkanker. P53 werd gekozen vanwege een eerder gepubliceerd effect van p53 mutaties op WNT-activiteit. Om dit te onderzoeken hebben we naar WNT-activiteit, in de vorm beta-catenine expressie, en naar p53 en SMAD4 expressie gekeken in humaan weefsel van darmkanker. We hebben ingezoomd op het invasieve front; de plek waar de kanker door het omliggende weefsel groeit. Hierbij zagen we dat zowel verlies van SMAD4 als afwijkende p53 expressie geassocieerd is met hoge WNT-activiteit in het invasieve front. SMAD4 onafhankelijke BMP-signalering is dus belangrijk voor invasie en het ontstaan van metastasen, zoals we zagen in hoofdstuk 3, en moduleert WNT-activiteit in het invasieve front. Onze volgende vraag was in hoeverre factoren in het stroma, dit zijn de omliggende celstructuren, invloed hebben op de kankercellen. Zorgt mogelijk niet alleen de kanker zelf voor progressie, maar speelt de omgeving ook een rol? En wat is de functie van BMP-signalering in deze mogelijk tumor-stroma interactie.

Hoofdstuk 5: De invloed van stroma

In dit hoofdstuk vragen we ons af of het stroma een bron kan zijn van BMPs waardoor SMAD4 onafhankelijke BMP-signalering onder andere aan het invasieve front wordt geactiveerd. BMPs zijn morphogenen die BMP-signalering kunnen activeren. Eerdere studies lieten zien dat de aanwezigheid van een grote

hoeveelheid stroma zorgt voor een slechtere overleving. Opvallend was hierbij dat dit voornamelijk het geval was bij tumoren waarbij SMAD4 niet aanwezig was. Wij vroegen ons af waarom dit zo is.

Stroma bestaat uit allerlei verschillende celtypen. Het meest voorkomende celtype in het stroma is de fibroblast. Daarom hebben we gekeken naar de interactie tussen darmkanker cellen en fibroblasten. Door gebruik te maken van *in vitro* invasie assays vonden we dat SMAD4 negatieve kankercellen sneller naar fibroblasten toe migreren. Mogelijk produceren fibroblasten iets wat voor migratie van kankercellen zorgt. Dit werd ondersteund doordat we dit experiment herhaald hebben met geconditioneerd medium van fibroblasten; dat is oud medium waarin de fibroblasten enige tijd hebben gezeten. Hierbij zagen we hetzelfde effect; SMAD4 negatieve kankercellen migreren naar het geconditioneerde medium van fibroblasten. Vervolgens hebben we het effect van kankercellen op fibroblasten onderzocht. Wanneer fibroblasten in contact komen met SMAD4 negatieve kankercellen dan produceren ze meer BMP2. BMP2 is een van de BMPs die de signalering kan activeren. Onze theorie is dat fibroblasten uit het stroma BMP2 produceren wanneer ze in de buurt zijn van SMAD4 negatieve kankercellen. BMP2 activeert vervolgens het SMAD4 onafhankelijk BMP-pad in deze kankercellen, wat zorgt voor meer migratie, invasie en uiteindelijk metastasen van de kankercellen. Dit hebben we vertaalt naar de kliniek door te bewijzen dat de aanwezigheid van BMP2 in het stroma van colorectaal kanker is geassocieerd met een slechtere overleving in SMAD4 negatieve kankers.

Hoofdstuk 6 en 7: Het voorspellen van overleving

Naast *in vitro* en *in vivo* studies hebben we ons ook bezig gehouden met het vinden van prognostische markers gebruik makend van het BMP-signaalpad. Voorspelling van patiënt overleving speelt een belangrijke rol in behandel beslissingen. De voorspellende waarde van het verlies van SMAD4 verschilt echter per studie. In hoofdstuk 6 hebben we deze studies samengenomen in een meta-analyse waarbij we zien dat de mate van SMAD4 expressie een goede voorspeller van overleving is. Opvallend was dat elke studie een eigen scorings methode had om te bepalen wat positief en negatief was. In hoofdstuk 7 hebben we gekeken of geactiveerd SMAD1,5,8 en SMAD2,3 ook een voorspellende waarde hebben. We hebben phospho-SMADs (geactiveerde SMADs) gekleurd in humaan

colorectaal weefsel. Nucleaire expressie van pSMAD1,5,8 en pSMAD2,3 is een teken van respectievelijk geactiveerde BMP-signalering en geactiveerde TGFbeta signalering. We vonden echter geen associatie tussen nucleaire pSMAD expressie in darmkanker en de overleving van patiënten. Waarom het verlies van SMAD4 wel geassocieerd is met een slechtere overleving en verlies van nucleair p-SMAD niet, kan verschillende redenen hebben. SMAD4 verlies zorgt voor uitschakeling van zowel BMP als TGFbeta. Nucleair phospho-SMADs betekent activatie van de canonical signaalpaden. Mogelijk heeft SMAD4 verlies nog invloed op andere paden. Daarnaast is de phospho kleuring niet zo robuust; het kunnen dus op technisch vlak geen ideale markers zijn.

Hoofdstuk 8: Een uitstapje naar alvleesklierkanker

Alvleesklierkanker heeft een zeer matige overleving met een 5 jaarsoverleving van ongeveer 4% (afhankelijk naar welke studie je kijkt). Dit komt deels doordat ten tijde van de diagnose er al lokale invasie of metastasen op afstand zijn waardoor een operatie vaak niet mogelijk is. Verder is de respons op chemotherapie beperkt. Ook in alvleesklierkanker komt inactivatie van SMAD4 voor en is dit geassocieerd met een slechtere overleving. Om die reden hebben we een exploratieve studie gedaan naar de rol van het BMP-pad in alvleesklierkanker. We zagen dat in 53,7% van de gevallen er een verminderde expressie is van BMP-receptor 1A en dat geassocieerd is met een slechtere overleving in patiënten waarbij SMAD4 nog intact is. Vervolgens hebben we BMPR-receptor 1A expressie *in vitro* gemanipuleerd waarbij vermindering van de expressie zorgde voor meer celdeling (proliferatie) en meer invasie. In een volgende studie willen we kijken hoe we het BMP kunnen gebruiken als doel van behandeling van alvleesklierkanker (niet in deze thesis).

Hoofdstuk 9: Uit de oude doos, statines!

In hoofdstuk 9 presenteren we onze laatste studie van de thesis. Hier hebben we niet gekeken naar directe manipulatie van het BMP-signaalpad, maar naar statines. In eerdere studies hebben we darmkanker cellen behandeld met statines en zagen toen activatie van het BMP signaalpad. Aangezien statines al jarenlang relatief veilig worden gebruikt voor vermindering van cardiovasculair risico, is het een ideaal middel. Het voordeel is dat het bijwerkingspatroon uitgebreid bekend is. Een ander voordeel is dat vanwege wijdverspreid gebruik er retrospectieve

studies mogelijk zijn. Er zijn al veel studies geweest naar het gebruik van statines als chemopreventie (het voorkomen van kanker) met zeer wisselende resultaten. Er is veel minder onderzoek gedaan naar het gebruik van statines als behandeling voor kanker.

Wij hebben een grote observationele studie gedaan waarbij we hebben gekeken naar statine gebruik na de diagnose darmkanker en hierbij zagen we een associatie met een verminderd risico op overlijden. Als we kijken naar onze *in vitro* data zien we dat statines BMP activeren, maar alleen als SMAD4 aanwezig is. Statines zouden dus theoretisch alleen hun werk kunnen doen in SMAD4 positieve kankers. Dit is ook wat wij vonden in ons cohort. Als de patiënten werden verdeeld in SMAD4 positief en SMAD4 negatief, dan hadden statines alleen een positief effect op de overleving bij patiënten met SMAD4 positieve darmkanker. Opgemerkt moet worden dat er gerandomiseerde studies nodig zijn om dit te bevestigen.

Concluderend, met deze thesis zijn we iets meer te weten gekomen over de rol van BMP-signalering in de darm en in de ontwikkeling van darmkanker. Verder hebben we gepoogd nieuwe prognostische markers te vinden of bekende markers te optimaliseren. Als laatste hebben we gekeken naar mogelijkheden om het BMP-pad te gebruiken als doel van kankerbehandeling in de vorm van BMP-inhibitie, BMP-activatie, ROCK-inhibitie en statine behandeling,

