



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Exploring the mechanisms of metastatic onset for novel treatment strategies

Zhao, G.

Citation

Zhao, G. (2023, December 5). *Exploring the mechanisms of metastatic onset for novel treatment strategies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3665669>

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/1887/3665669>

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

Nederlandse Samenvatting

Kanker is wereldwijd een van de meest dodelijke ziekten. Er is de afgelopen decennia een verontrustende toename in diagnosepercentages geweest, waarbij ook steeds meer jonge individuen worden getroffen. Door het brede scala aan kankertypen, organen, weefsels en celtypen die leiden tot diverse kankerfenotypen, vereist de behandeling van tumoren ontwikkeling van op maat gemaakte therapeutische benaderingen op basis van tumor-specifieke kenmerken. Ondanks aanzienlijke vooruitgang in kankeronderzoek, vormen agressieve uitzaaiingen, heterogeniteit en medicijnresistentie nog steeds grote uitdagingen bij het bestrijden van tumorcellen via conventionele behandelingen, helaas vaak tot gevolg van secundaire of meervoudige recidieven en uiteindelijke patiëntensterfte. Het is daarom cruciaal om meer aandacht te besteden aan de ontwikkeling van meer gerichte, efficiënte en veilige behandelingsmogelijkheden.

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 1**, is tumoruitzaaiing een zeer ingewikkeld proces dat begint met veranderingen in celadhesie aan naburige cellen en de extracellulaire matrix binnen de oorspronkelijke tumorplaats. Deze transformatie activeert cruciale cellulaire paden, welke verlopen via integrine, adhesie-eiwitten en CD44. Dit resulteert in de hermodellering van het cytoskelet, veranderde celmorphologie en de overgang van een epitheliaal naar een mesenchymaal fenotype, bekend als epitheliale-mesenchymale overgang (EMT). Vervolgens dringt een subset van deze cellen de bloedbaan binnen en wordt deze verspreid door het lichaam via de bloedcirculatie, waardoor ze aanzienlijke omgevingsstress ondervinden. Hoewel de meerderheid van deze cellen bezwijkt onder de zware omstandigheden in de bloedbaan, kan een klein deel, genaamd circulerende tumorcellen (CTC's), overleven en uiteindelijk de bloedvaten verlaten door een proces genaamd extravasatie. Na extravasatie keren CTC's terug naar hun oorspronkelijke toestand voor ze de bloedbaan in gingen. Ze maken de overgang van een mesenchymale naar een epitheliale toestand door een proces dat bekend staat als mesenchymale-epitheliale overgang (MET) en beginnen snel te groeien, waardoor nieuwe tumoren ontstaan. Steeds meer bewijs benadrukt het belang van een speciale subset van tumorcellen met stamcelachtige eigenschappen tijdens de metastase. Deze cellen, genaamd kankerstemcellen (CSC's) worden gekenmerkt door CD44⁺/CD24⁻ en staan bekend om dat ze tijdens deze cascade van gebeurtenissen de uitzaaiing van tumoren stimuleren. Gezien de cruciale rollen die CTC's en CSC's spelen bij kankeruitzaaiing, hebben we als doel om de complexe intracellulaire signaalpaden geassocieerd met deze celtypen in kaart te brengen. Hiervoor zullen wij gebruikmaken van zebavis-xenotransplantatiemodellen en organoïden afkomstig van patiënten.

In **Hoofdstuk 2** richtten we ons op CSC-achtige cellen afkomstig van prostaatkankerpatiënten. Tijdens uitgebreide analyse van klinische datasets observeerden we een hoge expressie van cel-matrix-interactie-genen, celadhesie-eiwitten en de mechanosensor TAZ binnen deze populatie. We creëerden zebavis-xenotransplantatie- (PDX) en organoïde-modellen afkomstig uit patiënten om de mechanistische reactie van cellen op matrixstijfheid te observeren, inclusief de door cellen gegenereerde krachten. Onze bevindingen tonen aan dat mechanische transductie een sleutelrol speelt bij het vormgeven van de CSC-achtige populatie bij prostaatkankeruitzaaiingen. Deze mechanische signaal-as begint bij β 1-integrine-signalering, wat resulteert in activatie van ILK, CDC42 en N-Wasp-afhankelijke

cytoskeletspanning gevolgd door TAZ-nucleaire translocatie. Activering van dit signaalpad leidt tot de expressie van stamcellengenen NANOG en OCT4, wat uiteindelijk leidt tot de vorming van uitzaaiende tumoren. Hier opvolgend gebruikten we farmacologische remming van TAZ om met succes prostaatcancer (PCa)-uitzaaiingen in zebravissen en de groei van PDX-afgeleide organoïden uit te schakelen (**Tabel 1**). Deze resultaten benadrukken de rol van mechanotransductie bij het bevorderen van de agressiviteit van prostaatcancer en laten zien dat dit een veelbelovend therapeutisch doel voor toekomstig onderzoek is.

Tabel 1. Nieuwe kankerbehandelingen die beschreven worden in deze thesis.

<i>Naam</i>	<i>Mechanisme</i>	<i>Type medicijn</i>	<i>Toepassing</i>
<i>K975</i>	K975 inhibeert de interactie tussen YAP1/TAZ en TEAD, met als gevolg gereduceerde stamcel-achtige eigenschappen in kankercellen	Chemisch molecuul	Prostaatcancer: PC-3, PC-3M-Pro4, C4-2B/LAPC9 Organoïden
<i>Rapalink-1 en SBI-0206965</i>	De synergistische inhibitie van mTOR en AMPK signaalpaden leidt tot verminderde overleving van CTCs	Chemisch molecuul	Prostaatcancer: PC-3M-Pro4, LAPC9 Organoïden
<i>Ru-p(HH)</i>	Lokale licht-geïnduceerde activatie resulteert in vrijkoming van cytotoxische ruthenium-ionen	Chemisch molecuul	Glioblastoom: U87MG
<i>Ru-p(MH)</i>	Lokale licht-geïnduceerde activatie resulteert in vrijkoming van cytotoxische ruthenium-ionen	Chemisch molecuul	Glioblastoom: U87MG
<i>Ru-p(MM)</i>	Lokale licht-geïnduceerde activatie resulteert in vrijkoming van cytotoxische ruthenium-ionen	Chemisch molecuul	Glioblastoom: U87MG
<i>AKPC-siYAP/TAZ</i>	CD44-specifieke LNPs leveren YAP1/TAZ siRNA aan tumorcellen om tumorgroei te remmen	siRNA	Borstcancer: MDA-MB-231, HCC38 Prostaatcancer: LAPC9 Organoïden
<i>APC-sgPLK1</i>	CD44-specifieke LNPs leveren Cas9 mRNA en PLK1 sgRNA aan tumorcellen om tumorgroei te remmen	Cas9 mRNA + sgRNA	Melanoom: SK-MEL-28/A375

In **Hoofdstuk 3** lag de focus van ons onderzoek op de transformatie van prostaatcancer cellen tot CTC's, die metabole herprogrammering doormaken om zich aan te passen aan de diverse stressfactoren binnen het circulatiesysteem. Hoewel eerdere studies benadrukten dat metabole hermodellering van de AMPK- en mTOR-pathways tumorgroei bevordert, bleef het onduidelijk of vergelijkbare processen zich voordoen in eerdere stappen, zoals bij de overleving van CTC's. Om deze kenniskloof te overbruggen, onderzochten we de dynamische activering van AMPK en mTOR in de circulatie. Via een reeks *in vitro* en *in vivo* experimenten ontdekten we dat AMPK gedeeltelijk kan compenseren voor de metabole tekortkomingen als gevolg van verminderde mTOR-functie tijdens cellulaire stress, wat het overleven van tumorcellen bevordert. Bovendien ontdekten we dat toediening van een mTOR-remmer, zoals momenteel gebruikt wordt in chemotherapeutische behandelingen, de activering van AMPK induceerde. Op basis van deze informatie hebben we een nieuwe therapeutische

benadering bedacht waarbij zowel mTOR- als AMPK-remming wordt gebruikt om de eerste stappen van uitzaaiingen te bestrijden. Deze gecombineerde behandeling vertoont synergetische effectiviteit bij het elimineren van tumoren, zowel *in vitro* in LAPC9-organoïden afkomstig van prostaatkankerpatiënten, als *in vivo* in zebrafismodellen. Deze bevindingen benadrukken het potentieel van therapeutische strategieën die gelijktijdig beide mTOR- en AMPK-pathways aanpakken om prostaatkanker te remmen, en onthullen op de complexe interactie tussen metabole herprogrammering en het overleven van tumorcellen tijdens uitzaaiingen.

In **Hoofdstuk 4** evalueerden we de therapeutische doeltreffendheid foto-geactiveerde medicijnen gericht op integrine. Om selectiviteit en biocompatibiliteit te verbeteren, maken we gebruik van peptideconjugatie van anti-kanker medicijnen. In deze studie hebben we cyclische, foto-geactiveerde ruthenium-peptide prodrugs ontworpen die specifiek zijn afgestemd op actieve targeting van glioblastoomcellen. Deze nieuw ontworpen chemische verbindingen maken gebruik van de Ac-X₁RGDX₂-NH₂ pentapeptide, die integrine-specifiek is en zich bindt aan het rutheniumcentrum via twee licht-afbreekbare coördinatiebindingen met de aminozuurresiduen X₁ en X₂ (X₁ of X₂ = His/H of Met/M). We hebben drie verbindingen gesynthetiseerd en gekarakteriseerd met de algemene formule [Ru(Ph₂phen)²(Ac-X₁RGDX₂-NH₂)]Cl₂ (Ph₂phen = 4,7-difenyl-1,10-fenantroline). We hebben uitgebreide *in vitro* en *in vivo* onderzoeken uitgevoerd en ontdekt dat het mechanisme van foto-geactiveerde celdodding varieerde afhankelijk van de specifieke aan metalen gebonden aminozuurresiduen. Interessant genoeg vertoonden, ondanks de verschillende mechanismen, alle drie de Ru-peptide conjugaten, namelijk Ru-p(HH), Ru-p(MH) en Ru-p(MM), vergelijkbare antitumor effecten tegen glioblastoom in het zebrafis-xenotransplantaatmodel. Deze verbindingen vertoonden effectieve targeting van hersentumoren, wat kan worden toegeschreven aan hun vermogen om de bloed-hersenbarrière (BBB) te passeren, een belangrijke hindernis bij de toediening van anti-kanker medicijnen aan glioblastoompatiënten. Deze bevindingen benadrukken het potentieel van integrine-specifieke gerichte foto-geactiveerde medicijnen in de behandeling van glioblastoom.

In **Hoofdstuk 5** verschoof onze focus naar het ontwikkelen en testen van de therapeutische doeltreffendheid van op siRNA gebaseerde anti-kanker middelen die worden afgeleverd door lipide nanoparticles (LNPs). Net als foto-geactiveerde therapie heeft RNA-therapie zichzelf bewezen als veelbelovende modaliteit voor kankerbehandeling, inclusief nauwkeurige regulering van kankerverwante genen. Hoewel LNPs momenteel de meest geavanceerde klinisch goedgekeurde niet-virale vectoren voor RNA-therapie vertegenwoordigen, wordt hun antitumor-effectiviteit beperkt door hun neiging om voornamelijk in de lever op te hopen na systemische toediening. Er is dus behoefte aan verbetering van de afleverings-efficiëntie van LNPs aan tumorcellen. Om dit aan te pakken, hebben we een reeks lipopeptiden (AKPC) in LNPs geïntroduceerd, waarbij een CD44-specifiek doelgericht peptide A6 (KPSSPPEE) is opgenomen. Door middel van deze aanpassing hebben we een tumor-specifiek LNP-leveringssysteem gecreëerd dat in staat is om siRNAs af te leveren die zich richten op de transcriptie co-activators YAP en TAZ. Als gevolg van de CD44-specifieke lipopeptide-aanpassingen hebben we significante verbetering waargenomen in de tumor-specifieke targeting van LNPs naar borstkanker, zowel *in vitro* als *in vivo*. Door middel van encapsulatie van siYAP/TAZ, induceerden CD44-peptide gemodificeerde LNPs effectief gen-silencing,

apoptose en celdood in 2D-celculturen en 3D-sferoïde culturen. In een zebrafish xenotransplantaatmodel van borsttumorcellen induceerde intraveneuze toediening van CD44-doelgerichte LNPs robuuste silencing van YAP/TAZ en downstream genen, wat leidde tot aanzienlijk meer tumoronderdrukking in vergelijking met kale LNPs. Samengevat presenteerde onze studie een efficiënt lipid nanoparticle-platform voor doelgerichte kankertherapie.

Gedurende het onderzoek dat in deze thesis wordt gepresenteerd, hebben we de moleculaire mechanismen verkend die het gedrag van tumorcellen tijdens metastase reguleren. We hebben een combinatie van *in vitro* experimentele validaties, zebrafishmodellen en organoïden afkomstig van patiënten gebruikt om de impact van belangrijke paden die betrokken zijn bij CSC's en CTC's tijdens tumoruitzaaiing te onderzoeken. Op basis van deze bevindingen hebben we met succes een reeks diverse nieuwe therapeutische strategieën ontwikkeld en gevalideerd. Tumor-gerichte therapeutica die we hebben ontwikkeld zijn; chemische moleculen die zich richten op remming van de YAP/TAZ signaaltransductie, combinatietherapieën met dubbele mTOR/AMPK-remmers, licht-geactiveerde chemotherapie mogelijk gemaakt door ruthenium-peptide conjugaten, en systemische genterapie met behulp van peptide-targeting, nanoparticle-delivery en RNA-interferentie.

Op dit moment worden mTOR-remmers gebruikt als tumoronderdrukkende medicijnen, maar er zijn ook studies die ontdekt hebben dat tumorcellen resistentie ontwikkelen tegen mTOR-remmers. Gezien de interactie tussen AMPK en mTOR, geloven we dat een combinatie van geneesmiddelen de effectiviteit van de behandeling kan vergroten en resistentie kan voorkomen. We hopen dat verder onderzoek naar de moleculaire mechanismen die kankercellen gebruiken om te overleven nieuwe opties blootleggen voor andere geneesmiddelcombinaties. Naast conventionele small-molecule inhibitors hebben wij onderzoek verricht naar gerichte licht-geactiveerde chemotherapie. Dit leverde veelbelovende resultaten op voor de behandeling van hersenkanker, parallel aan reeds gevestigde chemotherapieën. Bijzonder opmerkelijk is de hogere doeltreffendheid van met peptide afgestemde rutheniumkoppelaars bij de behandeling van hersenkanker. Daaropvolgend hebben we bewezen dat deze verbindingen met succes de bloed-hersenbarrière kunnen passeren, een van de belangrijkste obstakels voor dergelijke behandelingen. Deze doorbraak onderstreept het potentieel van deze verbindingen als therapeutische behandeling.

Zoals eerder benoemd, is een belangrijke uitdaging bij chemische geneesmiddelen de ontwikkeling van resistentie tegen de behandeling. Om dit te omzeilen is de focus in het veld verschoven naar snelle ontwikkeling van op genterapie gebaseerde anti-kanker medicijnen. Deze therapeutische middelen zijn echter meestal onstabiel. Daarom is het van cruciaal belang om een afleveringssysteem te ontwikkelen wat zorgt voor effectieve delivery in een kort tijdsbestek. Door gebruik te maken van peptide-modificaties in combinatie met een door de FDA goedgekeurd nanoparticle-systeem hebben we een aanzienlijke verbetering bereikt in zowel in de efficiëntie van de levering van nucleïnezuurtherapeutica als in de nauwkeurigheid van tumorcellen targeten. Deze methode om nanoparticles te modifieren is veelbelovend voor integratie met proteomische technieken, wat de identificatie van nog nauwkeurigere tumorcel-specifieke targets zal vergemakkelijken. Dergelijke ontwikkelingen zullen de weg effenen voor de ontwikkeling van steeds meer op maat gemaakte en verfijnde nanoparticle afleveringssystemen.

Hoewel we erkennen dat de tot nu toe behaalde resultaten beperkt zijn in hun preklinische toepassing, geloven wij dat ze een robuuste *proof of concept* vertegenwoordigen en het hun potentiële kracht laten zien.

