

Coloncarcinoomceladhesie is afhankelijk van het extracellulaire milieu en drukgeïnduceerde activatie van intracellulaire kinasen

Colon cancer cell adhesion depends on the extracellular environment and pressure induced intracellular signaling

J.R.N. van der Voort van Zyp

Samenvatting

Op 2 juni 2010 promoveerde dhr. drs. J.R.N. van der Voort van Zyp aan de Rijksuniversiteit te Groningen op het promotieonderzoek getiteld 'Coloncarcinoomceladhesie is afhankelijk van het extracellulaire milieu en drukgeïnduceerde activatie van intracellulaire kinasen' onder begeleiding van de promotors dhr. prof. dr. H.J. Hoekstra, verbonden aan het Universitair Medisch Centrum in Groningen, en dhr. prof. dr. M.D. Basson, verbonden aan Michigan State University in Lansing, Verenigde Staten. Hieronder zijn de belangrijkste bevindingen van zijn onderzoek weergegeven. (*Ned Tijdschr Oncol* 2011;8:176-9)

Summary

On the 2nd of June 2010, drs. J.R.N. van der Voort van Zyp defended his thesis successfully at the University of Groningen. The title of his dissertation was 'Colon cancer cell adhesion depends on the extracellular environment and pressure induced intracellular signalling'. His promotors were professor H.J. Hoekstra, MD, PhD, who is affiliated to the University Medical Center in Groningen, and professor M.D. Basson, MD, PhD, who is affiliated to Michigan State University in Lansing, United States. This article describes the most relevant results of his research.

Inleiding

Het colorectaal carcinoom is de derde meest voorkomende oorzaak van kankergerelateerde mortaliteit voor mannen en vrouwen in de Verenigde Staten.¹ Rond het 65^e levensjaar heeft ongeveer 5% van de Nederlandse bevolking een colorectale tumor ontwikkeld. Dit kan variëren van een vroeg benigne poliep tot een invasief adenocarcinoom. Gedurende de afgelopen jaren is er veel vooruitgang geboekt met betrekking tot de behandeling en prognose van het colorectaal carcinoom. Dit is met name te danken aan verbeteringen in de chirurgische technieken en adjuvante behandelingen. Deze vooruitgangen zijn totale mesorectale excisie, de resectie van lever- en longmetastasen, verbeteringen in chemoradiatie en

'drug targeting' therapieën tegen het colorectaal carcinoom.

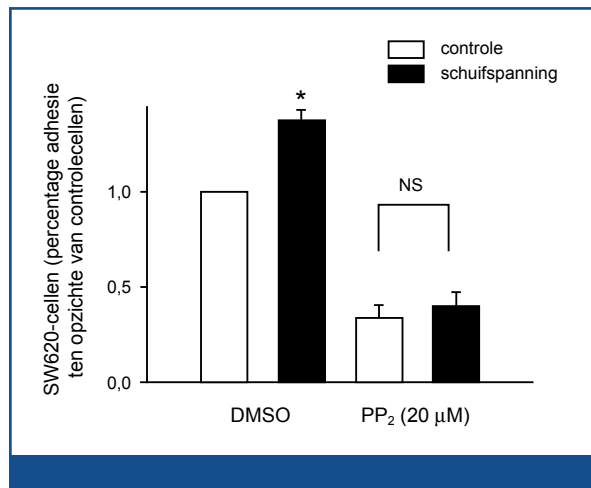
Ondanks deze nieuwe ontwikkelingen komen postoperatief losgeraakte of systemisch circulerende tumorcellen vaak voor bij coloncarcinoompatiënten. Uit recent onderzoek blijkt dat de implantatie van tumorcellen waarschijnlijk wordt gereguleerd. Tegenwoordig zijn er steeds meer aanwijzingen dat tumorcellen hun eigen adhesie kunnen beïnvloeden. Cellen die in de bloedsomloop of in de peritoneale ruimte terechtkomen, worden blootgesteld aan fysische krachten. Bij verhoogde extracellulaire druk worden focale adhesiekinasen en geassocieerde eiwitten geactiveerd, die de bindingscapaciteit van de β_1 -integrine beïnvloeden.² Het gevolg is dat de receptoren op de cel-

Auteur: dhr. drs. J.R.N. van der Voort van Zyp, AIOS radiotherapie, afdeling radiotherapie, Leids Universitair Medisch Centrum, p/a Van Diepenburchstraat 33, 2597 PS Den Haag, tel.: 06 24 65 78 38, e-mailadres: j.r.n.van_der_voort_van_zijp@lumc.nl

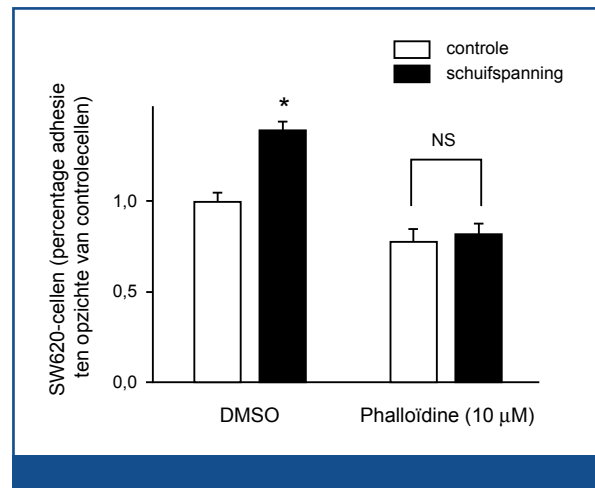
Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

Trefwoorden: adhesie, extracellulaire druk, focale adhesiekinasen, paxilline, schuifspanning

Key words: adhesion, extracellular pressure, focal adhesion kinase, paxillin, shear pressure



Figuur 1. De sarcoomkinaseremmer PP₂ voorkomt schuifspanninggeïnduceerde coloncarcinoomceladhesie aan collageen I. DMSO=dimethylsulfoxide, NS=niet significant, *=significant.



Figuur 2. Phalloïdinebehandeling voorkomt schuifspanninggeïnduceerde coloncarcinoomceladhesie aan collageen I. DMSO=dimethylsulfoxide, NS=niet significant, *=significant.

membraan worden geactiveerd, waardoor de affiniteit van de tumorcel toeneemt. Tot op heden is weinig bekend over het mechanisme waarbij intracellulaire signalen voorafgaand aan adhesie de integrineaffiniteit beïnvloeden. Daarnaast blijkt dat het extracellulaire milieu invloed heeft op de adhesie van tumorcellen.³ In dit proefschrift worden de intra- en extracellulaire mechanismen onderzocht, die mogelijk van belang zijn voor in-vitro- en in-vivo adhesie van coloncarcinoomcellen. De overexpressie en -activatie van bepaalde intracellulaire eiwitten door fysische krachten komen ook voor bij sommige hoofd-halstumoren.⁴ Om deze reden hebben we ook onderzocht of fysische krachten de adhesie van plaveiselcelcarcinoomcellen van de tong kunnen beïnvloeden.

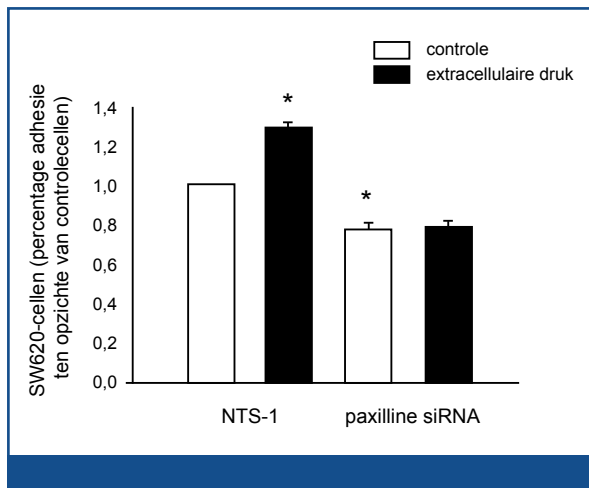
Methoden

De in-vitroadhesiestudies zijn verricht met SW620- en Caco 2-coloncarcinoomcellen, en SCC25-plaveiselcelcarcinoomcellen van de tong. De eerste studie onderzocht de invloed van de sarcoom (Src)-kinaseremmer PP₂ en phalloïdine (een cytoskeletstabilisator) op de adhesie van SW620-coloncarcinoomcellen die waren blootgesteld aan schuifspanning. De cellen werden eerst behandeld met de Src-kinaseremmer PP₂ of met phalloïdine. Daarna werden de cellen blootgesteld aan controleomstandigheden of schuifspanning. Vervolgens werd de adhesie van de cellen aan collageen bepaald. In de tweede studie werd de invloed van ‘small interfering’ ribonucleïnezuur (siRNA) tegen paxilline of focale adhesiekinase onder-

zocht in cellen die werden blootgesteld aan verhoogde extracellulaire druk voorafgaand aan de adhesie. De derde studie onderzocht de invloed van verhoogde extracellulaire druk op de adhesie van SCC25-plaveiselcelcarcinoomcellen van de tong. De activiteit van intracellulaire signalen werd bepaald door de cellen in suspensie te brengen en vervolgens de fosforylatiestatus te bepalen. In-vitrokinaseassay en western-blottechnieken werden in de studies gebruikt om fosforylatie van de intracellulaire signalen te bepalen onder de verschillende omstandigheden. De in-vivostudies werden verricht met de transplantabele coloncarcinoommuiscellijn 26/51 in een muismodel.⁵ De cellen werden eerst voorbehandeld met een controlesubstraat of met de Src-kinaseremmer PP₂. Daarna werden de cellen gedurende 30 minuten blootgesteld aan controleomstandigheden of verhoogde extracellulaire drukomstandigheden. Vervolgens werd de celsuspensie geïmplanteerd in de chirurgische wond in de lies van de muis. De non-adherente cellen werden weggespoeld en adhesie werd gekwantificeerd door middel van ⁵¹Cr-telling. In een parallelstudie werden cellen alleen behandeld met kationen, voordat zij werden geïmplanteerd in de chirurgische wonden. De non-adherente cellen werden weggespoeld en de muizen werden gedurende 100 dagen geobserveerd.

Resultaten

Uit onze in-vitrostudies blijkt dat adhesie van epitheliale carcinoomcellen toeneemt na blootstelling aan fysische krachten, zoals verhoogde extracellu-

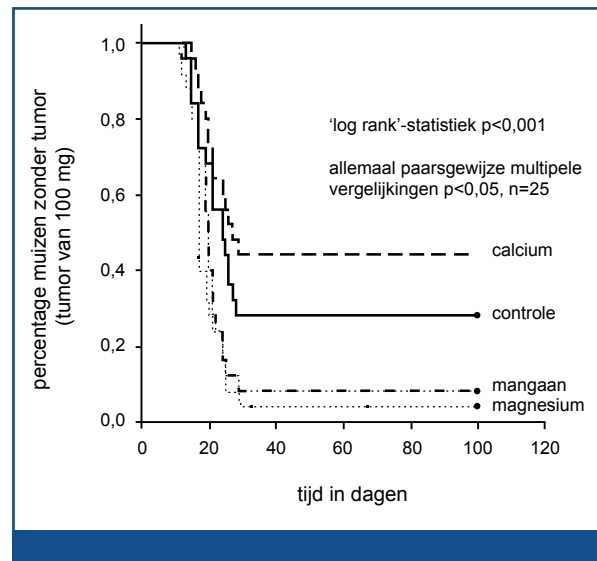


Figuur 3. Verhoogde extracellulaire druk stimuleert adhesie van SW620-cellen die zijn behandeld met NTS-1, terwijl siRNA tegen het paxilline-eiwit basale adhesie vermindert en drukgestimuleerde adhesie blokkeert. siRNA='small interfering' ribonucleïnezuur, *=significant.

laire druk en schuifspanning, die ook peroperatief aanwezig zijn. De cytoskeletstabilisator phalloïdine en de Src-kinaseremmer PP_2 verminderen schuifspanninggeïnduceerde adhesie van SW620-coloncarcinoomcellen (zie *Figuur 1* en *2*).⁶

Overexpressie van paxilline wordt gezien in verschillende agressieve epitheliale tumoren. Paxilline is een focaal adhesiegeassocieerd eiwit, dat mogelijk het cytoskelet aan het focale adhesiecomplex bindt. Verhoogde extracellulaire druk veroorzaakt fosforylatie van paxilline in SW620- en Caco 2-coloncarcinoomcellen en SCC25-plaveiselcelcarcinoomcellen van de tong.^{7,8} Inhibitie van paxilline blokkeert drukgestimuleerde adhesie van SW620- en Caco 2-coloncarcinoomcellen in vitro.⁸ In SCC25-plaveiselcelcarcinoomcellen van de tong is dit niet onderzocht. De focale adhesiekinasen en Src-kinasen (focale adhesie-eiwitten) werden tevens geïnhibeerd door siRNA tegen paxilline onder toegenomen extracellulaire druk in SW620- en Caco 2-coloncarcinoomcellen.⁸ Paxilline blijkt een bovenstreams eiwit in het proces van drukgestimuleerde adhesie. Ook is in een muismodel aangetoond dat de Src-kinaseremmer PP_2 drukgestimuleerde adhesie blokkeert (zie *Figuur 3*).⁹

Een drukonafhankelijk extracellulair mechanisme is ook betrokken bij celadhesie. Zowel magnesium en mangaan bevorderen adhesie, terwijl calcium een remmend effect heeft op adhesie van tumorcellen aan chirurgische wonden bij muizen. In een over-



Figuur 4. De kaplan-meiergrafiek geeft de incidentie van 100 mg tumoren weer in een muismodel gedurende 100 dagen. In dit muismodel zijn de tumorcellen voorafgaand aan chirurgische implantatie in lieswonden blootgesteld aan kationen of aan een controlesubstraat.

levingsstudie werd aangetoond dat muizen, die met calcium waren behandeld, veel minder tumoren ontwikkelden en een betere overleving hadden.¹⁰ De tijdsduur waarbij een tumorcel na adhesie kan ontwikkelen tot een waarneembare palpabele tumor van 100 mg is 60 dagen (palpatie van tumoren kleiner dan 100 mg is niet betrouwbaar). Indien er na 100 dagen geen palpabele tumor aanwezig was, werd de muis tumorvrij beschouwd (zie *Figuur 4*).

Discussie en conclusie

Er is steeds meer bewijs dat tumorcellen hun adhesie aan matrixeiwitten, endotheliale cellen of chirurgische wonden reguleren via intracellulaire signalen. Deze intracellulaire signalen zijn gevoelig voor extracellulaire druk en regelen de bindingsaffiniteit van matrixreceptoren door middel van β_1 -integrine heterodimeren.² Het blijkt dat een intact cytoskelet ook van belang is voor celadhesie. Tijdens blootstelling aan fysische krachten ontstaat depolymerisatie van actinefilamenten, waardoor actinecytoskeletreorganisatie plaatsvindt. Hierdoor neemt de rigiditeit van de cel af, waardoor de contacttijd toeneemt en een groter celoppervlak in aanraking komt met het collageen. Mogelijk fungeert het cytoskelet als een externe sensor die bij fysische krachten de focale adhesie-eiwitten stimuleert. De interactie tussen het cytoskelet en de focale adhesie-eiwitten is tot op heden nog niet ontrafeld.

Daarnaast is er ook een drukonafhankelijk extracellulair mechanisme betrokken bij celadhesie. Wellicht is het in de toekomst mogelijk om de buikholte peroperatief te spoelen met calciumkationen om het aantal wondrecidieven te verminderen. Niettemin zal systemische behandeling gericht tegen de intracellulaire signalen waarschijnlijk van groter klinisch belang zijn. Behandeling met systemische therapie zal niet alleen lokale wondrecidieven voorkomen, maar mogelijk ook metastasen op afstand.

Referenties

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *Ca Cancer J Clin* 2010;60:277-300.
2. Basson MD, Yu CF, Herden-Kirchoff O, Ellermeier M, Sanders MA, Merrell RC, et al. Effects of increased ambient pressure on colon cancer cell adhesion. *J Cell Biochem* 2000;78:47-61.
3. Thamilselvan V, Fromby M, Walsh M, Basson MD. Divalent cations modulate human colon cancer cell adhesion. *J Surg Res* 2003;110:255-65.
4. Niimi K, Yoshizawa M, Nakajima T, Saku T. Vascular invasion in squamous cell carcinomas of human oral mucosa. *Oral Oncol* 2001;37:357-64.
5. Corbett TH, Griswold DP Jr, Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM Jr. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res* 1975;35:2434-9.
6. Thamilselvan V, Patel A, Van der Voort van Zyp J, Basson MD. Colon cancer cell adhesion in response to Src kinase activation and actin-cytoskeleton by non-laminar shear stress. *J Cell Biochem* 2004;92:361-71.
7. Conway WC, Van der Voort van Zyp J, Thamilselvan V, Walsh M, Crowe DL, Basson MD. Paxillin modulates squamous cancer cell adhesion and is important in pressure-augmented adhesion. *J Cell Biochem* 2006;98:1507-16.
8. Van Zyp JV, Conway WC, Craig DH, Van Zyp NV, Thamilselvan V, Basson MD. Extracellular pressure stimulates tumor cell adhesion in vitro by paxillin activation. *Cancer Biol Ther* 2006;5:1169-78.
9. Van der Voort van Zyp J, Thamilselvan V, Walsh M, Polin L, Basson MD. Extracellular pressure stimulates colon cancer cell adhesion in vitro and to surgical wounds by Src (sarcoma protein) activation. *Am J Surg* 2004;188:467-73.
10. Van der Voort van Zyp J, Conway WC, Thamilselvan V, Polin L, Basson MD. Divalent cations influence colon cancer cell adhesion in a murine transplantable tumor model. *Am J Surg* 2005;190:701-7.

Ontvangen 12 augustus 2010, geaccepteerd 2 november 2010.