

Nederlandse Samenvatting



“Well! I've often seen a cat without a grin,' thought Alice 'but a grin without a cat! It's the most curious thing I ever saw in my life!”

Lewis Carroll, *Alice in Wonderland*

Kanker is een veelvoorkomende ziekte met 100.000 nieuwe gevallen per jaar. De ziekte wordt gekenmerkt door ongecontroleerde groei van weefsels vanwege een aanhoudende celdeling. Gezonde cellen in het lichaam delen alleen wanneer dat nodig is (bijvoorbeeld om wondjes te genezen). Tijdens celdeling krijgen de cellen een specifieke functie en zodoende ook een specifieke vorm en grootte, dit proces heet differentiatie van de cel. Je lichaam heeft stamcellen die ervoor zorgen dat vanuit 1 cel een nieuwe groep cellen (die ook gedifferentieerd zijn) kan groeien. Het delen en differentiëren van cellen gebeurt door signalen die gegeven worden. Deze signalen kunnen van buiten de cel komen (zoals chemische stofjes, virussen) maar ook van binnenuit (eiwitten). Zowel de uitwendige als de inwendige signalen kunnen de cel laten delen of remmen de celdeling. Dit proces van groei stimulatie en remming van groei staat onder strenge controle in de cel. Als cellen ontsnappen aan deze controle en er een ontregeling plaatsvindt tussen de balans van groei stimulatie en groei remming in het voordeel van de groei factoren dan kan er een onbeheerste groei ontstaan. Deze onbeheerste groei kan goedaardig of kwaadaardig zijn. Bij kwaadaardige groei spreken we van kanker, deze cellen zijn in staat om het orgaan waarin ze zitten te vernietigen en kunnen zich ook verspreiden door het lichaam. Goedaardige tumorcellen beschadigen alleen het orgaan waarin ze zitten en kunnen zich niet verspreiden in het lichaam.

Tot op heden is kanker een ziekte die moeilijk te bestrijden is en zodoende wordt er veel onderzoek gedaan naar hoe kankercellen werken en hoe deze anders zijn ten opzichte van een gezonde cel. Momenteel zijn er vele soorten therapieën in de kliniek beschikbaar, echter zijn deze behandelingen (bv chemotherapie en radiotherapie) niet specifiek voor de kankercellen en werken ze ook op de gezonde cellen, waardoor de patiënt vaak last heeft van bijwerkingen. Door te ontdekken hoe een kankercel werkt, kan men gericht medicijnen zoeken die de kankercel dood maken, maar de gezonde cel geen schade berokkent. Daarnaast wordt er ook onderzoek gedaan naar nieuwe stoffen die chemisch gemaakt zijn of in de natuur zijn gevonden, deze nieuwe stoffen worden getest in een laboratorium op verschillende soorten kankercellen om te onderzoeken wat voor effect deze stoffen hebben op de vitaliteit van de cellen. Via zo'n soort test is Betulinezuur (BetA) ontdekt. Dit stofje dat voorkomt in onder andere berkenbomen blijkt in staat te zijn om kankercellen dood te maken terwijl het geen schadelijke effecten heeft op de gezonde cel. Dit proefschrift gaat over BetA en hoe het kankercellen dood maakt, daarnaast is er ook een hoofdstuk wat een bio-informatisch algoritme beschrijft over het ontdekken en benoemen van lipiden (vetten)

In **hoofdstuk 1** beschrijven we de literatuur van de afgelopen jaren over kanker, de therapieën van kanker, de verschillende vormen van celdood die er zijn en het metabolisme (stofwisseling) van de cel en hoe deze anders is in een kankercel. Daarnaast wordt BetA geïntroduceerd, hoe het stofje ontdekt is, en wat er tot nu toe bekend is over onder andere het werkingsmechanisme van BetA geïnduceerde celdood.

Het is bekend dat BetA een vorm van gereguleerde celdood induceert die apoptose wordt genoemd. Echter als we deze vorm van celdood remmen met specifieke remmers (caspase remmers) is er nog een groot deel van de kankercellen welke alsnog dood gaan. Dit is alleen mogelijk als er een ander celdood mechanisme is die dit veroorzaakt. In **hoofdstuk 2** is er gekeken naar welke vormen van celdood er naast apoptose worden geïnduceerd door BetA. We zijn begonnen met het kijken naar necroptose, een vorm van gereguleerde celdood welke alleen kan optreden in een cel als er geen caspases zijn. Om te zien of necroptose deel uitmaakt van BetA geïnduceerde celdood hebben we naast apoptose ook necroptose geremd. De combinatie van deze remmers zouden als deze vormen van celdood door BetA geïnduceerd worden, moeten leiden tot 100% levende cellen aangezien we beiden vormen van celdood geremd hebben. Echter zagen we in deze proef dat de kankercellen nog steeds dood gingen na behandeling met BetA, hieruit kunnen we concluderen dat een andere vorm van celdood betrokken moet zijn.

De aandacht is vervolgens gevestigd op autofagie, een vorm van celdood waarbij de cel zichzelf als het ware opeet om de opgegeten delen vrij te geven aan de omgeving om als voeding te dienen. Vaak wordt autofagie ook gezien als een overlevingsmechanisme, omdat de cel zichzelf opeet om andere cellen van bouwstenen te voorzien. Autofagie is een proces waarbij onderdelen van de cel in een blaasje worden gestopt, ook wel autofagosoom (een soort vuilniszakje) genoemd. Om het "afval" op te ruimen moet het blaasje samensmelten met een lysosoom (de vuilverbranding), waarbij de inhoud van het blaasje wordt afgebroken en gerecycled. Dit proces van complete afbraak wordt ook wel autofagische flux genoemd.

In **hoofdstuk 2** laten we zien dat BetA een massale vorm van autofagie induceert, door het meten van een eiwitvorm (LC3II) wat voorkomt op de blaasjes (vuilniszakken). Met behulp van de microscoop zagen we dikke groene puntjes van het eiwit ontstaan terwijl we met eiwitmetingen (Western Blot) zien dat de LC3II vorm zichtbaar wordt na behandeling met BetA. Soms gebeurt het wel eens dat het afval niet verwerkt wordt in de lysosomen en dat je daardoor zo'n hoge hoeveelheid LC3II meet. Om te zien of autofagische flux (de samensmelting van het blaasje met lysosoom en dus complete afbraak van het afval) plaatsvindt, is dit gemeten door gebruik te maken van een LC3 eiwit wat is gekoppeld aan een rode en groene kleur. Als rood en groen gemengd worden, ontstaat er een gele kleur, tijdens het proces van autofagische flux wordt de groene kleur afgebroken in het lysosoom terwijl de rode kleur blijft. Behandeling met BetA laat een rode kleur achter in de cellen wat tot de conclusie leidt dat er volledige afbraak is. Dit is ook aangetoond door het meten van afbraak van radioactieve lang levende eiwitten.

Mitochondriën zijn energiefabriekjes van de cel en ze zijn betrokken bij apoptose. Mitochondriën hebben poortjes die open en dicht kunnen, waarbij er stofjes van binnen het mitochondrion naar buiten kunnen (bv cytochroom c, wat celdood (apoptose) induceert).

Eerder onderzoek liet zien dat cyclosporine A (een stofje wat mitochondriale poortjes dicht houdt) de kankercellen in leven houdt door remming van apoptose. We waren benieuwd wat dit stofje doet op de autofagie inductie. We zagen dat er minder autofagie werd geïnduceerd in combinatie van BetA met cyclosporine A dan met BetA alleen. Dit suggereert dat geïnduceerde autofagie een gevolg is van de schade die BetA geeft aan de mitochondriën.

Bij autofagie eet de cel zichzelf op om een andere cel van voeding te voorzien. Autofagie is al bij lagere concentraties BetA te zien, mogelijk wijzend op dat autofagie vooral een overlevingsmechanisme is na BetA behandeling. Het is echter ook denkbaar dat de massale inductie van autofagie na BetA behandeling resulteert in een disbalans tussen overleving en celdood en dat autofagie inductie een celdood mechanisme is. Om dit te onderzoeken is er gebruik gemaakt van cellen die bepaalde eiwitten missen die belangrijk zijn voor autofagie en zodoende kunnen deze cellen niet langer autofagie induceren. Als we deze cellen behandelden met BetA zagen we meer celdood ontstaan en dus is autofagie een overlevingsmechanisme in de cel. Het blijft echter onduidelijk welke vorm van celdood BetA naast apoptose induceert.

In **hoofdstuk 3** bestudeerden we de vorm van apoptose meer in diepgang. Apoptose is een vorm van gereguleerde celdood die op 2 manieren plaats kan vinden. Via een receptor pathway (een sleutel en slot principe, je steekt een sleutel in een slot en het slot kan open, waarbij de sleutel een proces in gang zet waarbij stofjes aangezet worden die leiden tot celdood) of via een mitochondriale pathway (waarbij het energiefabriekje van de cel lek raakt en er stofjes (oa. cytochroom c) vrij komen die celdood induceren). Omdat BetA de mitochondriale route induceert hebben we gekeken wat er gebeurt met de mitochondriën zelf. We zagen dat de structuur van de mitochondriën verandert na behandeling met BetA. Het binnen membraan (cristae) van de mitochondriën wat normaal gesproken lange strepen laat zien is na behandeling met BetA rond geworden. Dit is een zeer opmerkelijke waarneming en deze ronde structuren van de cristae van mitochondriën zijn ook zichtbaar in Barth syndroom patiënten. Deze patiënten hebben een defect in het *Taffazin* gen waardoor zij een meer verzadigde vorm hebben van cardiolipine (CL).

CL is een lipide (vet) wat vier vetzuurketens heeft en voornamelijk voorkomt in de mitochondriën waar het betrokken is bij de structuur van de cristae en tevens ook cytochroom c vasthoudt in de mitochondriën. De zijketens van CL kunnen verschillen in lengte en in verzadigingsgraad. Meer verzadigd vet (zoals roomboter) betekent dat deze minder flexibel is als onverzadigd vet (zoals olie). Het is belangrijk voor de cel om een juiste balans te hebben tussen verzadigd en onverzadigd vet, omdat veel verzadiging leidt tot starre vetten die niet meer flexibel zijn en aangezien vetten voorkomen in membranen kan dit leiden tot structuur veranderingen en verandering in functionaliteit van het membraan.

Omdat de veranderingen in de mitochondriale cristae na BetA behandeling zo lijken op de cristae in Barth syndroom patiënten hebben we de levels en verzadiging van CL gemeten. We zagen dat CL meer verzadigd raakt na behandeling met BetA. We vroegen ons toen af wat de oorzaak is van verzadiging. In het lichaam worden vetten opgenomen uit de voeding of kunnen worden aangemaakt. In kankercellen maakt de cel liever vetten aan dan dat het deze opneemt uit de voeding, waarschijnlijk omdat kankercellen zo snel delen en meer vetten nodig hebben als bouwsteen. Nieuwe vetten maken gebeurt via een ingewikkeld proces wat resulteert in een verzadigd vetzuur. Het lichaam maakt onverzadigde vetten via een enzym stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) wat het verzadigd vetzuur omzet in een onverzadigd vetzuur. Deze vetzuren kunnen dan in alle lipiden ingebouwd worden.

We bedachten dat BetA misschien invloed heeft op dit enzym, zodoende werd de activiteit van dit enzym gemeten. We zagen dat na BetA behandeling of behandeling met een SCD-1 remmer de activiteit van dit enzym was geremd en er dus meer verzadigd vetzuur aanwezig was in de cellen. De vraag was nu of remming van SCD-1 met een specifieke SCD-1 remmer ook dezelfde veranderingen in de mitochondriën opleverde, en inderdaad remmen van SCD-1 met de SCD-1 remmer leidt ook tot mitochondriale veranderingen en CL verzadiging. We hebben daarna gekeken of het toevoegen van extra onverzadigde vetzuren in combinatie met BetA de morfologie van de mitochondriën hersteld en of ook CL levels weer normaal werden. Het toevoegen van extra onverzadigde vetzuren bij BetA behandeling resulteerde in vermindering van veranderingen in de mitochondriën en ook in CL verzadigingsgraad. Het tegenovergestelde werd aangetoond met de combinatie van verzadigd vetzuur en BetA, in deze combinatie werd de structuur van de mitochondriën nog slechter dan met BetA alleen en ook waren de CL levels meer verzadigd dan na BetA behandeling alleen. Daarnaast lieten we zien dat BetA of SCD-1 beiden cytochroom c vrij laten uit de mitochondriën en celdood induceren en dat de combinatie van SCD-1 remming (door BetA ofwel SCD-1 remmer) en extra verzadigd vetzuur tot meer uitscheiding van cytochroom c leiden en tot grotere inductie van celdood. Dit terwijl toevoeging van onverzadigd vetzuur de schadelijke effecten van BetA of SCD-1 tegengaan en er juist minder cytochroom c vrijgelaten wordt en er minder celdood ontstaat. In dit hoofdstuk hebben we een nieuwe celdood route ontdekt die specifiek kankercellen raakt. Gezonde cellen zijn minder afhankelijk van SCD-1 activiteit dan kankercellen en daardoor zijn kankercellen veel gevoeliger voor BetA.

Kankerstemcellen zijn een onderdeel van de tumor die zelf vernieuwende eigenschappen hebben en in verschillende andere cellen kunnen differentiëren. Er wordt van deze cellen gedacht dat zij zorgen voor het terugkomen van de kanker na behandeling en voor de verspreiding (metastasering) van de tumor door het lichaam. Kankerstemcellen kunnen namelijk van 1 losse cel een hele nieuwe groep kankercellen maken en kankerstemcellen zijn ook nog eens erg ongevoelig voor de verschillende vormen van therapie. Een grote uitdaging in het kankeronderzoek is dan ook het begrijpen hoe deze cellen werken en het

vinden van therapieën die ook deze cellen dood maken. In **hoofdstuk 4** hebben we de werking van BetA op darmkankerstemcellen getest. Tot onze verbazing werkt BetA zeer effectief op kankerstemcellen en zelfs sneller dan in kankercellen. Al na 2 uur zien we een celdood inductie in de totale populatie van de cellen. Als we specifiek kijken naar het effect op kankerstemcellen zien we dat BetA ook in 10% van de kankerstemcellen celdood induceert en daarnaast werd ook een verlaging van zelfvernieuwing geobserveerd. De huidige standaardtherapie voor darmkanker, oxaliplatin bleek in langdurige experimenten minder effectief dan BetA in het verminderen van uitgroei van de darmkankerstemcellen. Dit suggereert dat bij oxaliplatin resistentie tegen het middel op lijkt te treden terwijl dit bij BetA niet gebeurt. Om te kijken of darmkankerstemcellen ook de beschreven nieuwe celdood route uit hoofdstuk 2 volgen werden darmkankerstemcellen behandeld met SCD-1 remmer. Ook met SCD-1 remmer werd een celdood geïnduceerd, echter was deze niet zo snel als bij BetA. Verder onderzoek naar het precieze mechanisme en de werking van BetA in darmkankerstemcellen is nodig.

Omdat het remmen van SCD-1 (via BetA of SCD-1 remmer) leidt tot een ophoping van verzadigde vetzuren die in elk lipide ingebouwd kunnen worden hebben we gekeken wat de effecten van BetA op lipiden in het algemeen is (dus niet alleen CL). Het meten van lipiden (vetten) is een langdurig en ingewikkeld proces. Zodoende hebben we in **hoofdstuk 5** alle lipiden geanalyseerd met een nieuwe methode (lipide pipeline) die sneller en nauwkeuriger lipiden kan herkennen. We beschrijven de opzet van deze pipeline en testen we de werking van deze methode door gebruik te maken van BetA behandelde cellen. Met deze nieuwe bio-informatische methode kunnen we veel sneller en meer lipiden herkennen en benoemen dan voorheen. We hebben verschillende fosfolipiden kunnen identificeren en we hebben bekeken wat de verschillen waren tussen onbehandelde en behandelde cellen. We zagen dat er significante verschillen waren in de totale waarden van sommige lipiden (bv PG en BMP). In CL totaal levels is geen significant verschil gevonden terwijl we wel verschil zien in verzadigingsgraad van de zijketens. In PG en BMP daarentegen zien we verschillen in totale levels maar niet in de verzadiging. Waarom BetA alleen CL meer verzadigd maakt moet verder worden onderzocht.

In **hoofdstuk 6** worden de resultaten van de voorgaande hoofdstukken bediscussieerd in de context van literatuur en wordt er besproken hoe BetA en SCD-1 remming een rol kunnen spelen in toekomstige therapie. Tevens bespreken we de rol van deze lipide pipeline in de kliniek.

Samenvattend laten we zien dat vetzuurmetabolisme, in het specifiek CL verzadiging, een zwakke schakel is in de kankercel en dat dit een mogelijk nieuw aangrijpingspunt is voor therapie.

List of Publications



“Why, sometimes I’ve believed as many as six impossible things before breakfast.”

Lewis Carroll, *Alice in Wonderland*

Potze L*, Pras-Raves ML*, van Lenthe H, Vervaart MAT, Kessler J.H, Luyf AC, Medema JP, et al. Improved identification of lipids using physico-chemical properties: application to lipidomics analysis of Betulinic acid treatment *Manuscript submitted* *Equal contribution

Potze L*, di Franco S*, Kessler JH, Stassi G Medema JP. Betulinic acid induces a rapid form of cell death in colon cancer stem cells. *Manuscript submitted*. *Equal contribution

Potze L, Di Franco S, Grandela C, Pras-Raves ML, Picavet DI, van Veen HA, et al. Betulinic acid induces a novel cell death pathway that depends on cardiolipin modification. *Oncogene*. 2015.

Tirinato L, Liberale C, Di Franco S, Candeloro P, Benfante A, La Rocca R, **Potze L**, et al. Lipid droplets: a new player in colorectal cancer stem cells unveiled by spectroscopic imaging. *Stem cells*. 2015;33(1):35-44.

Potze L, Mullauer FB, Colak S, Kessler JH, Medema JP. Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response. *Cell DeathDis*. 2014;5:e1169.