

Toekenning Prijs Octaaf Dupontfonds van de Koninklijke Vlaamse Academie van België voor Wetenschappen en Kunsten aan Prof. Dr. Luc Leyns (Faculteit Wetenschappen, Vakgroep Biologie, Laboratorium voor Cellulaire Genetica) voor het project:

“Homeostase en stamcellen in de darm: de rol van de Wnt-signalisatie pathway”

Dikke darmkanker of colonkanker is één van de meest voorkomende kankers in de Westerse samenleving. Ongeveer 1 op 20 mensen wordt geconfronteerd met deze vorm van kanker. Een belangrijke risicofactor voor dikke darmkanker is een dieet rijk aan vetten en arm aan vezels. Bovendien spelen twee genen een cruciale rol bij dikke darmkanker: enerzijds het APC gen (APC = *Adenomatous Polyposis Coli*) dat gemuteerd is in 85% van de colontumoren en anderzijds het beta-catenine gen dat in het merendeel van de overige colontumoren is gemuteerd. De eiwitproducten van deze twee genen maken deel uit van de Wnt-signalisatie *pathway*. In deze *pathway* zal een gesecreteerd eiwit, de Wnt-factor, aan de buitenkant van de cel een signaal doorgeven, via een receptor aanwezig op het celmembraan, naar de binnenzijde van de cel. In de cel zullen verschillende intracellulaire eiwitten op hun beurt dit signaal doorsturen naar de kern. Daar zal dit signaal de activatie van doelwitgenen van de Wnt-*pathway* veroorzaken. In een darmkankercel zijn het APC en/of beta-catenine eiwit op zo'n wijze veranderd dat het lijkt alsof er voortdurend een signaal afkomstig van de Wnt-factor aanwezig is. Zo worden de doelwitgenen van de Wnt-*pathway* continu geactiveerd.

In dit project zal in een eerste fase de rol van de Wnt-signalisatie *pathway* in het darmepitheel van de normale muis bestudeerd worden. De muis vormt voor dit onderzoek een geschikt proefdier omdat de structuur van de darm in mens en muis zeer gelijkaardig is. Bovendien volgt darmkanker in mens en muis hetzelfde genetische patroon. Ook komt de Wnt-signalisatie *pathway* in eenzelfde verschijningsvorm voor in mens en muis.

Meer specifiek zal er gekeken worden naar de rol van afgescheiden Wnt-moleculen in het behoud van de weefselhomeostase in de dunne en dikke darm. In een tweede fase zullen de gevolgen van de ontregeling van de Wnt-signalisatie *pathway* in het darmweefsel onderzocht worden: de Wnt-*pathway* zal kunstmatig gestimuleerd (upgereguleerd) of onderdrukt (downgereguleerd) worden in een strikt induceerbaar transgeen muismodel.

Het darmepitheel van de muis is een zeer dynamisch weefsel dat zichzelf snel en onafgebroken vernieuwt. Het darmepitheel in de dunne darm is opgebouwd uit buisvormige

instulpingen of crypten en vingervormige uitsteeksels: de darmvlokken of villi. Deze typische structuren vergroten de absorptiecapaciteit van de darm enorm. In de dikke darm zijn enkel crypten aanwezig. In de bodem van de crypten in dunne en dikke darm bevindt zich een klein groepje stamcellen dat continu deelt en zo aanleiding geeft tot proliferatieve cellen. Deze proliferatieve cellen hebben een grote delingscapaciteit en op hun beurt differentiëren ze tijdens hun migratie langsheen de crypte(-villus) as tot de verschillende functionele celtypen van de darm. De overbodige gedifferentieerde cellen aan het puntje van de villus (in dunne darm) of de top van de crypte (in dikke darm) worden verwijderd via spontane *apoptose* of geprogrammeerde celdood. In de muis duurt deze celmigratie langsheen de crypte (-villus) as 3 tot 5 dagen. In het darmepitheel bestaat er dus een dynamisch, maar subtiel evenwicht tussen celproliferatie, -differentiatie en -dood. Wanneer dit evenwicht of de weefselhomeostase verstoord wordt en er meer celproliferatie dan celdood optreedt, kan kanker ontstaan.

De Wnt-genen (tot nu toe zijn er zestien leden gekend in de muis) coderen voor gesecreterde proteïnen die werken als signalisatie-moleculen in het embryo en ook in het volwassen dier. Wnt-1, het eerste Wnt-gen dat werd ontdekt, speelt een rol in de vorming van borstkanker bij de muis. Studies van geninactivatie van verschillende Wnt-genen hebben aangetoond dat de Wnt-moleculen de signalen geven die het lot van de embryonale cellen (*cell-fate*) sturen en de embryonale celgroei dirigeren in een grote verscheidenheid aan organismen, van nematode wormen over fruitvliegjes tot zoogdieren. Er bestaan ook anti-Wnt moleculen of Wnt-antagonisten, Frzb-moleculen genaamd. Deze Frzb-moleculen zullen op de Wnt-moleculen binden en zo de signaalfunctie van de Wnts inhiberen.

In de darm is de Wnt-signalisatie *pathway* van groot belang voor het behoud van de stamcellen en bovendien wordt deze *pathway* ontregeld tijdens dikke darmkanker zodat de stamcellen sneller en meer gaan delen en er zo overprolifererende (en overwoekerende) kankercellen ontstaan. Bij de mens werd aangetoond dat Wnt-2 overuitgedrukt wordt in colonkanker en bovendien op een laag niveau wordt uitgedrukt in normale dikke darmcellen. Ook vertonen muizen die mutant zijn voor de transcriptiefactor Tcf-4 –dit is een sleutelfactor in de Wnt-signalisatie *pathway* - deficiënties in het darmepitheel als gevolg van een gebrek aan stamcelproliferatie. Er werd ook aangetoond dat twee andere componenten van de Wnt-*pathway*, namelijk APC en beta-catenine (zie ook hierboven) zeer frekwent gemuteerd zijn in colontumoren. Al deze vaststellingen impliceren dat de Wnt-*pathway* in de darm een functie heeft in de differentiatie en organisatie van het normale darmepitheel én ook een bepaalde rol speelt bij de overproliferatie van het darmepitheel die optreedt bij darmkanker.

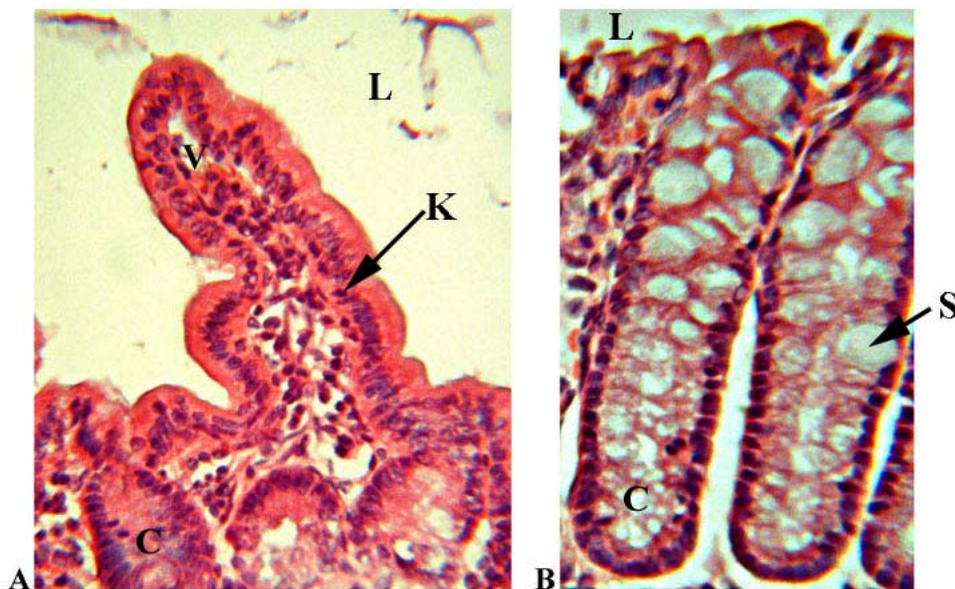
Prof. Dr. L. Leyns heeft zijn licentiaats- en doctoraatsdiploma in de biologie (specialisatie genetica) behaald aan de *Université Libre de Bruxelles*. Daarna heeft hij een postdoctorale opleiding gevolgd in Mexico en vervolgens in een laboratorium van ontwikkelingsbiologie (onder leiding van Prof. Dr. E. De Robertis) van het *Howard Hughes Medical Institute* in de *University of California, Los Angeles* (V.S.A.). Daar heeft hij de gesecreteerde Wnt-antagonist Frzb-1 in de kikker *Xenopus*, de muis en de mens ontdekt. Het onderzoek waarvoor Dr. Leyns de Prijs van het Octaaf Dupontfonds heeft gekregen, zal hij uitvoeren in samenwerking met C. Kemp (BAEF-doctoraatsstudente (*Belgian American Educational Foundation*)) en A. Lebacqz (IWT-doctoraatsstudente (*IWT-Vlaanderen: Instituut voor de aanmoediging van Innovatie door Wetenschap en Technologie in Vlaanderen*)). Deze Prijs, ter waarde van 500.000 Bef (12400 €), wordt tweejaarlijks uitgereikt door de KVAB (*Koninklijke Vlaamse Academie van België voor Wetenschappen en Kunsten*) om onderzoek te bevorderen op het gebied van de menselijke en dierlijke fysiologie en fysiopathologie, met toepassing van biotechnologische methoden.

In dit onderzoek zullen eerst de Wnt- en Frzb-moleculen die worden uitgedrukt in het darmweefsel, geïdentificeerd worden. Vervolgens zal de Wnt-*pathway* gemanipuleerd worden via de ontwikkeling en studie van transgene muizen die beschikken over een strikt induceerbaar transgeen systeem. Deze transgene muizen bevatten twee verschillende genetische *constructs* (specifieke DNA-sequenties): het induceerbare en het reagerende *construct*. Het induceerbare *construct* codeert voor een DNA-bindende proteïne die na binding met een synthetisch hormoon het reagerende *construct* zal activeren. Het induceerbare *construct* staat onder controle van een darmspecifieke promotor zodat deze kunstmatige genactivering enkel kan optreden in de darm. In het reagerende *construct* wordt dan een doelwitgen geplaatst. Dit doelwitgen zal enerzijds het Wnt-gen en anderzijds het Frzb-gen zijn dat normaal in de darm wordt uitgedrukt om de Wnt-*pathway* te up- of downreguleren. Dit zal toelaten om na inspuiting van het inducerende synthetische hormoon in dubbel-transgene muizen (dit zijn muizen die over het induceerbare én reagerende *construct* beschikken) de Wnt- of Frzb-uitdrukking in het volwassen darmepitheel aan te drijven.

In deze twee typen dubbel-transgene muizen zal de Wnt-*pathway* dan gemanipuleerd kunnen worden om de homeostase van de volwassen dunne en dikke darm te prikkelen. Tot slot

zullen we via deze induceerbare transgene muizen de tijdsduur en intensiteit van de activering of repressie van de *Wnt-pathway* kunnen controleren en de daaropvolgende gebeurtenissen in de proliferatie-, differentiatie-, en apoptosecompartimenten van het darmepitheel kunnen analyseren op verschillende tijdstippen.

Via deze vernieuwende *in vivo* aanpak zullen we een unieke kijk krijgen op de verstoorde homeostase van het darmepitheel en op de verschillende genetische en cellulaire gebeurtenissen die betrokken zijn bij colonkanker.



Figuren: (A) doorsnede van een villus en crypte in de dunne darm
(B) doorsnede van twee crypten in de dikke darm

Legende: L = lumen of binnenkant darm, K = kern van een epitheelcel,
S = slijmbekercel (die hier vol slijm zit), V = villus, C = crypte