Universiteit
Leiden
The Netherlands

Integrin signaling modes controlling cell migration and metastasis

Truong, H.H.

Citation

Truong, H. H. (2011, October 27). *Integrin signaling modes controlling cell migration and metastasis*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/17990

Version:	Corrected 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/1887/17990

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

Nederlandse samenvatting en discussie

Nederlandse samenvatting en discussie

Embryogenese, wondheling, angiogenese en kanker metastasering zijn afhankelijk van cel motiliteit en adhesie dynamiek. Dit behelst een verschuiving in integrine expressie profielen, wat mogelijk de veranderende omgeving waarin cellen zich bevinden en zich door aanpassen weergeeft. Bijvoorbeeld, kwaadaardige cellen die van primaire naar secundaire plaatsen in het lichaam migreren komen extracellulaire matrix (ECM) tegen dat verschilt van compositie in vergelijking met hun plaats van oorsprong. In **hoofdstuk 2 en 3** van dit proefschrift wordt de rol van $\alpha5\beta1$ en $\alpha v\beta3$ fibronectine (FN)-bindende integrines in cel motiliteit en adhesie dynamiek bediscussieerd. Wij hebben aangetoond dat wanneer deze integrines ectopisch tot expressie worden gebracht in de zelfde cellulaire achtergrond (GE11), opmerkelijke verschillen in cellulaire functies (cel morfologie, cel-matrix adhesie dynamiek en lokalisatie) worden geobserveerd. Cellen die $\alpha5\beta1$ integrine tot expressie brengen, hebben een contractiele fibroblast-achtige morfologie met sterk dynamische centripetaal georiënteerde cel-matrix adhesies en migreren willekeurig. In tegenstelling tot cellen die $\alpha v\beta3$ integrines tot expressie brengen, wiens cel-matrix adhesies meer statisch en verdeeld over het basale oppervlak zijn en welke zeer persistent migreren.

Wat is de reden voor deze verschillen wanneer beide integrines interacties aangaan met FN? Een mogelijke verklaring zou de interactie van signalerings en/of adapter eiwitten met specifieke residuen binnen het cytoplasmische gedeelte van integrine zijn. Echter, experimenten waarin het α- en β-gedeelte werden verwisseld hebben laten zien dat dit waarschijnlijk niet aan de orde is. Ons onderzoek suggereert dat het eerder de manier waarop integrines met FN interacties aangaan is. Wij demonstreren dat zowel $\alpha5\beta1$ als $\alpha v\beta3$ aan geïmmobiliseerd (gestrekt) FN adheren, maar dat alleen $\alpha5\beta1$ aan oplosbaar gevouwen (inactief) FN kan binden. RGD in geïmmobiliseerd (gestrekt) FN is op dusdaninge manier georiënteerd dat het toegankelijk is voor beide integrines (Altroff et al., 2004). Het vermogen van $\alpha5\beta1$ om de RGD plaats te bereiken in oplosbaar FN wordt bewerkstelligt doordat dit integrine een additionele FN bindende regio heeft (Aota, Nomizu, and Yamada, 1994; Bowditch et al., 1994; Danen et al., 1995). Wij laten zien dat het plaatsen van de CTSEQNC hypervariabele sequentie uit het I-achtig domein van $\beta1$ in de context van $\beta3$ er voor zorgt dat $\alpha v\beta3$

in die conditie ook aan oplosbaar FN kan binden. Er is gesuggereerd dat de $\alpha5\beta1$ hypervariabele sequentie bindt aan de PHSRN "synergie" regio in IIIFN9 om de interactie met de RGD regio in IIIFN10 te stabiliseren door de hellingshoek tussen IIIFN10en IIIFN9 te veranderen, en daardoor de RGD lussen vrij te leggen. Onze bevindingen demonstreren dat integrine $\alpha v\beta3$, zelfs als het door verschillende mutaties vast zit in een hoge affiniteit toestand, slecht bindt aan oplosbaar FN omdat deze functionaliteit ontbreekt (Danen et al., 1995; Sechler, Corbett, and Schwarzbauer, 1997).

De associatie met de synergie regio verklaart mogelijk het klaarblijkelijke specifieke vermogen van $\alpha5\beta1$ voor het vormen van een "houtgreep" met FN en het bewerkstelligen van adhesie versterking (Friedland, Lee, and Boettiger, 2009; Roca-Cusachs et al., 2009). Belangrijker nog, onze bevindingen wijzen er op dat het wisselen tussen deze twee integrines die dusdanig verschillende ligand-interacties vormen, een sterke invloed heeft op intracellulaire processen, met effecten op RhoA activiteit, contractiliteit van het cytoskelet en ECM opbouw.

In **hoofdstuk 4** wordt een nieuwe $\alpha v\beta3$ bindingspartner beschreven die mogelijk ook bijdraagt aan de specifieke $\alpha v\beta3$-gemedieerde effecten op cel morfologie. MacMarcks (MRP) is betrokken bij de activatie van integrines en cel spreiding door het reguleren van het corticale actine netwerk (Jin and Li, 2002). Interessant is dat de expressie van $\beta3$ integrine leidt tot verminderde expressie van MRP op transcript niveau. Wij hebben gedemonstreerd dat de regio in de nabijheid van het NITY domein van het $\beta3$ gedeelte, wanneer geassocieerd met de αv subunit, zorgt voor verminderde expressie van MRP. Niettemin leidt suppressie van MRP expressie niet tot de bevordering van cel spreiding in de oorspronkelijke cellijn, en overexpressie heeft geen effect op cel spreiding in cellen die $\alpha v\beta3$ gebruiken voor adhesie. Dit suggereert dat $\beta3$ noodzakelijk is voor MRP lokalisatie en expressie maar dat MRP niet essentieel is voor $\alpha v\beta3$-gemedieerde cel spreiding (in tegenstelling tot $\beta2$ integrines, waarvan is aangetoond dat ze MRP-afhankelijk zijn voor cel spreiding (Li et al., 1996)).

Zoals beschreven in **hoofdstuk 5**, gaan bepaalde ziektes gepaard met veranderende expressie of functionaliteit van integrines. Bijvoorbeeld, hoge expressie niveaus van verscheidende types integrines zijn in een aantal soorten kanker gecorreleerd

aan tumor progressie (Mizejewski, 1999). Om die redenen zijn antagonisten zoals peptidomimetics en monoklonale antilichamen tegen $\alpha 5\beta 1$ of $\alpha v\beta 3$ ontwikkeld. Disintegrines zijn RGD-bevattende cysteine-rijke peptides in slangengif die verder ontwikkeld zijn als therapeutische middelen voor angiogenese-afhankelijke tumor groei en metastasering (Huang, 1998). Deze moleculen zijn echter erg groot en hebben een lage metabolische stabiliteit waardoor hun therapeutische toepassing beperkt is (McLane et al., 2004; Cai and Chen, 2006). Cyclisch RGD-bevattende pentapeptides zijn de meest gebruikte RSD-gebaseerde antagonisten (Ruoslathi, 1996). c(RGDf(NMe)V), ook wel Cilengitide genoemd (EMD 121974) (Goodman et al., 2002) induceert efficiënt apoptose in glioblastoma en medullablastoma (Taga et al., 2002). Integrine antagonisten kunnen worden toegepast in combinatie met cytotoxische antikanker therapie, zoals chemo- of radiotherapie om de therapeutische efficiënte te maximaliseren. Bijvoorbeeld, Cilengitide in combinatie met gemcitabine inhibeert tumoren met geavanceerd vasculatuur (Colomer, 2004; Raguse et al., 2004). Het is beschreven dat tumor-geassocieerde endotheel cellen kunnen ontsnappen aan cel dood door na blootstelling aan radiatie $\alpha v\beta 3$ verhoogd tot expressie te brengen. Moleculen zoals de $\alpha v\beta 3$ inhibitor S247 kunnen potentieel de groei van tumor cellen en angiogenese blokkeren en de fosforylering van PKB/Akt inhiberen (Abdollahi et al.m 2005).

Klassieke 2D kweek condities verschillen sterk van de in vivo situatie en beïnvloeden cel overleving, proliferatie, differentiatie, cytoarchitectuur, en migratie (Kenny PA et al., 2007; Bjerkvig, 1990; Bissell, 1981; Wapita and Hay, 2002; Corcoran et al., 2003; Beliveau et al., 2010). Voor metastase gerelateerde studies geven 3D invasie studies zoals de Boyden kamer analyse (trans-wel migratie analyse) waarschijnlijk ook niet de juiste representatie van tumor cellen die zich afscheiden van een solide tumor. Om deze reden zijn cel sferoïde (CS) culturen ontwikkeld die het micromilieu van solide tumoren nabootst. Deze CS behoren compact te zijn met een zuurstof- en voedingstoffen-loze kern. Dit is karakteristiek voor solide tumoren (Mueller-Klieser, 1987; Sutherlands, 1988). Daarbij behoort het ECM milieu dat de CS omringt dezelfde chemische (ECM eiwit type) en fysische (stijfheid, kruis-koppelingen) eigenschappen te hebben als dat van weefsel (Buxboim and Discher,2010; Friedl and Wolf, 2010, Leventhal et al., 2009). In **hoofdstuk 6** beschrijven we de ontwikkeling van een

nieuwe CS formatie methode in 3D collageen gelen die voldoet aan deze kriteria en die ook, voor het eerst, op een “high throughput” manier met hoge accuratie en reproduceerbaarheid uitgevoerd kan worden.

Onze methode, die gebaseerd is op microinjecties, levert een aantal voordelen op in vergelijking met andere methodes. Ten eerste, combineren wij CS formatie en gel inbedding in één stap. Op deze manier wordt de preparatie tijd verkort van dagen tot minuten. Ten tweede, formatie van CS uit een breed spectrum van cellen kan worden bereikt zonder additieven, zoals matrigel dat door andere groepen wordt gebruikt (Ivascu and Manfred, 2006, 2007). Ten derde, CS worden in gelijke groottes en vormen geproduceerd met een vooraf gedefinieerde ruimtelijke distributie, wat deze methode geschikt maakt voor microscopische screening. In tegenstelling tot andere technieken wordt de 2D weefselkweek stap overgeslagen en kunnen vers geïsoleerde tumor monsters uit muis en humane biopten direct gebruikt worden voor CS vorming. Met deze nieuwe methode hebben wij een geautomatiseerd 3D kweek systeem ontwikkeld dat gebruikt kan worden voor het testen van medicijnen voor gepersonaliseerde behandelings strategieën.

Volgens verschillende studies beïnvloedt β1 integrine de initiatie en groei van borstkanker. Blokkeren van β1 integrine met antilichamen maakt borstkanker tumoren in muizen gevoelig voor radiotherapie, wat aangeeft dat β1 integrine waarschijnlijk een geschikt doel is voor de ontwikkeling van medicijnen tegen borstkanker (White et al., 2004; Park et al., 2006). In **hoofdstuk 7** beschrijven we hoe het uitschakelen van β1 in borstkanker cellen inderdaad de groei van tumoren onderdrukt. Dit kan echter ook leiden tot verhoogde intravasatie en metastasering. Onze data ondersteunt een model waarin, bij de afwezigheid van β1 integrine, een epitheliale-tot-mesenchymale (EMT) transitie geïnduceerd wordt door E-cadherine op transcriptie niveau naar beneden te reguleren ten gevolge van een wisseling in de balans tussen de ZEB en mir-200 famillies. Vervolgens verschuiven de cellen van een samenhangende multicellulaire streng invasie naar migratie van individuele cellen in 3D matrices. Waarschijnlijk stelt deze verschuiving tumor cellen in staat tot een efficiëntere manier van intravasatie met een verhoogde migratie doordat de ballast van het migreren als een collectieve eenheid afvalt of doordat overlevings mechanismen om de stroming in het bloedvat

te weerstaan worden geactiveerd.

Experimenten die gebruik maken van inhiberende peptides en α2 subeenheid silencing constructen duiden aan dat van de β1 integrines de α2β1 metastasering onderdrukt in dit systeem. Van dit integrine is reeds aangetoond dat het omgekeerd gecorreleerd is met borstkanker progressie (Ramirez et al., 2010). Desondanks detecteren wij in patient materiaal geen algemeen verlies van α2 of β1 integrines dat gecorreleerd is aan E-cadherine verlies. Histologische secties geven alleen een momentopname uit het dynamische process van metastasering en missen mogelijk een belangrijke kwaadaardige modificatie in de metastase cascade. De verminderde expressie van E-cadherine naar aanleiding van de vermindering van β1-integrine-gemedieerde adhesie is mogelijk een tijdelijk proces dat in een subpopulatie van kanker cellen in een tumor voorkomt. Dit soort evenementen kunnen makkelijk over het hoofd worden gezien door de patholoog terwijl ze een belangrijke rol spelen in de metastasering van E-cadherine positieve borstkanker.

Van fundamenteel onderzoek tot klinische toepassingen blijken integrines hoogst interessante receptoren. Naast het mediëren van cel adhesie aan de micro-omgeving induceren integrines ook signaal transductie cascades die proliferatie, overleving en migratie reguleren. Zodoende blijken integrines bruikbare biomarkers en kunnen ze worden gebruikt als doel om medicijnen tegen te ontwikkelen in verschillende ziektes, waaronder kanker.