



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mechanisms of Ewing sarcoma metastasis : biochemistry and biophysics

Beletkaia, E.

Citation

Beletkaia, E. (2015, December 9). *Mechanisms of Ewing sarcoma metastasis : biochemistry and biophysics*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/37000>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/37000>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/37000> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Beletkaia, Elena

Title: Mechanisms of Ewing sarcoma metastasis : biochemistry and biophysics

Issue Date: 2015-12-09

SAMENVATTING

De eerste omschrijving van kanker dateert uit het eeuwenoude Ebers Papyrus uit 1500 BC. De term ‘metastase’, ongecontroleerde groei van cellen op ver afgelegen locaties, werd voor het eerst geïntroduceerd door Lobstein in het begin van de 19e eeuw. Stephen Paget suggereerde in 1889 een aanleg voor metastase gebaseerd op 735 dodelijke gevallen van borstkanker in verscheidene verslagleggingen. Hij introduceerde het concept van ‘zaad en voedingsbodem’, waarbij ‘zaden’ de kankercellen zijn die metastatische capaciteit hebben en de ‘voedingsbodem’ het weefsel of orgaan aanduidt dat de micro-omgeving voor groei geeft. Tot op heden is dit concept wijdverspreid geaccepteerd met een indrukwekkende hoeveelheid aan moleculaire inzichten, welke hebben geleid tot een beter begrip van zowel de ‘zaden’ als de ‘voedingsbodem’.

Ewing sarcoma, ontdekt in 1921, is een neoplasme in het bot, welke metastase vertoont op een vroeg tijdstip van de tumorontwikkeling. De ontwikkeling van metastase is gerelateerd aan een slechte prognose voor de patiënt en dus een lage overlevingskans op de lange termijn. Opmerkelijk is dat Ewing sarcoma metastase een goedgedefinieerde verdeling vertoont in het lichaam. Ewing sarcoma metastase is voornamelijk beperkt tot de longen, gevolgd door bot/beenmerg lokalisatie. In sommige gevallen wordt gelijktijdige long/bot/beenmerg metastase lokalisatie gerapporteerd. Metastase op andere locaties zijn zeldzaam. Zodoende kan de micro-omgeving van Ewing sarcoma metastase ofwel van de primaire tumor (bot) of heel erg verschillend (long) zijn. De consistentie van Ewing sarcoma lokalisatie impliceert daarmee een specifieke cellulaire voorkeur.

Vele studies probeerden het mechanisme achter het metastatisch gedrag van Ewing sarcoma te begrijpen. De metastatische aanleg bleek gecorreleerd te zijn met de expressie van de chemokine receptor CXCR6, de G-eiwit gekoppelde receptor GPR64, verhoogd niveau van interleukin

6, Caveolin 1, IGF-1R en een verhoogde activiteit van metalloproteinasen 2 en 9. Een bijzondere rol werd toegekend aan de chemokine receptor CXCR4, welke tot overexpressie kwam in metastatische Ewing sarcoma, en is gereguleerd door het Ewing sarcoma-specifieke fusie-eiwit EWS/FLI1. Het was eerder aangetoond dat EWS/FLI1 de architectuur en integriteit van het cytoskelet moduleert, wat wordt gezien als een verdere voorwaarde voor Ewing sarcoma metastase. Hoewel een significante hoeveelheid data beschikbaar is, is een volledig model van Ewing sarcoma metastase nog niet ontwikkeld. In dit proefschrift worden de biochemische en biofysische factoren betrokken bij Ewing sarcoma metastase verder verkend.

In **Hoofdstuk 2** werd microscopie van enkele moleculen toegepast om de dynamische eigenschappen van chemokine receptor CXCR4 op het plasmamembraan van een Ewing sarcoma cellijn (A673) te onderzoeken. De mobiliteit van CXCR4 op het plasmamembraan werd gedetecteerd met 30 nm positienauwkeurigheid en 50 ms tijdsresolutie. Deze tijds- en positieresolutie maakte het mogelijk om verschillende fracties/toestanden van de mobiliteit van CXCR4 te onderscheiden en transitieën tussen mobiele en immobiele toestanden van de receptor onder verschillende toestanden te volgen. Immobilisatie van CXCR4 vond plaats wanneer stimulatie met de ligand CXCL12 werd toegediend afhankelijk van de concentratie. De verandering van mobiliteit van de receptoren gedurende activatie leek afhankelijk te zijn van zowel signalen door G-eiwit afhankelijke en onafhankelijke cascades. Signalen via G-eiwitten resulteerden in CXCR4-immobilisatie mogelijk door een supramoleculair schavot (signaalosoom), welke dan het signaal zou kunnen versterken. Activatie van de G-eiwit onafhankelijke cascade, daarentegen, veroorzaakte immobilisatie van de receptor in clathrin-bedekte blaasjes welke geïnternaliseerd werden met minder gevoeligheid voor de receptor als gevolg. Aangezien signalen door G-eiwitten belemmerd leken te worden door endocytose van receptoren, geven de resultaten van deze studie aan dat er een functionele overspraak is tussen verschillende biochemische cascades.

De betrokkenheid van G-eiwit activatie in de regulatie van CXCR4 werd verder geadresseerd in de studie die wordt beschreven in **Hoofdstuk 3**. De dynamica van twee G_{α} subunits werd onderzocht in A673 cellen. Zowel $G_{\alpha q}$ als $G_{\alpha i}$ toonden een snelle respons op activatie van CXCR4 door de vorming van clusterachtige structuren. Enkel-molecuul beeldvorming openbaarde dat de twee G_{α} subunits een verschillende kop-

pelingsmodus volgen met de receptor. $G_{\alpha q}$ leek al vooraf gekoppeld aan de receptor en toonde ontkoppeling wanneer de receptor activeerde. $G_{\alpha i}$, daarentegen, was niet gekoppeld aan CXCR4 voor receptor activatie en toonde toegenomen koppeling met de receptor wanneer er werd gestimuleerd met CXCL12. Een dergelijk verschil in koppelingsmoduli van $G_{\alpha q}$ en $G_{\alpha i}$ suggereerde een sequentiële koppeling van de G-eiwitten aan CXCR4. Deze bevinding is in overeenkomst met de experimenten die de benodigde tijd analyseerden voor $G_{\alpha q}$ and $G_{\alpha i}$ om verdere cascades te initiëren. Gezien signalen via $G_{\alpha q}$ een vereiste zijn voor versterkte $G_{\alpha i}$ signalen is het vermogen van CXCR4 om beide G_{α} subunits te activeren wellicht een regulerend mechanisme voor het signaal van de receptor.

In **Hoofdstuk 4** wordt de ontwikkeling van een licht-geactiveerde chimerische receptor omschreven, inzetbaar voor activatie en detectie met hoge tijds- en positieresolutie. Het basisconstruct werd ontwikkeld door de uitwisseling van de intracellulaire lussen van de licht-geactiveerde GPCR rhodopsin met de intracellulaire lussen en het C-uiteinde van de chemokine receptor CXCR4. De kloonstappen resulteerden in een chimerische receptor, optoCXCR4, welke vermoedelijk CXCR4-specifieke signaalcascades kon initiëren door middel van licht-activatie. De opto-CXCR4 werd verder aangepast op zowel de N- als de C-uiteinden. Alle constructen werden getest op lokalisatie aan het plasmamembraan en op functionele eigenschappen. Een succesvol construct dat een veelbelovend werktuig voor verdere biofysische onderzoeken van chemokine receptor CXCR4 is werd ontwikkeld. Cruciaal voor de juiste functionaliteit van het construct was de correcte licht-beschermingsomstandigheden tijdens de experimentele procedures. De toepasbaarheid van deze veelbelovende aanpak in optogenetica werd verder bediscussieerd.

De afhankelijkheid van de stijfheid van de micro-omgeving van Ewing sarcoma metastase werd geadresseerd in de studie beschreven in **Hoofdstuk 5**. De ontwikkeling van Ewing sarcoma in botten met metastase naar ofwel bot of longen suggereerde een mogelijke mechanische invloed voor Ewing sarcoma metastase. Deze hypothese werd onderzocht met Ewing sarcoma-afgeleide cellijnen, welke de voorkeur toonden voor ver uiteen gelegen niches van bot (CHP100) en longen (6647). In 2D en 3D assays toonden 6647 cellen een sterke voorkeur voor een mechanisch zachte micro-omgeving. 6647 cellen konden alleen op zachte substraten aanhechtingen vormen en ontwikkelden een georganiseerd actine cytoskelet. CHP100 cellen, daarentegen, hechtten zich beter aan stijf-

vere substraten. De mechanische eigenschappen van de micro-omgeving veroorzaakten dus een verschil in gedrag van Ewing sarcoma cellen uit een verschillend metastatisch profiel. Bovendien werd het duidelijk dat dit mechanische phenotype onafhankelijk was van CXCR4 receptor activatie.

De resultaten in dit proefschrift geven tezamen een dieper inzicht in de mechanismes achter zowel de signalen van CXCR4 als de micro-omgeving respons waarin cellulair gedrag van Ewing sarcoma cellen worden bepaald. Door verschillende experimentele methodes is aangetoond dat zowel biochemische als biofysische geleiding bepalen hoe Ewing sarcoma ontwikkelt naar een specifiek metastatisch phenotype.