



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Focal adhesion kinase and paxillin : mediators of breast cancer cell migration

Verkoeijen, S.

Citation

Verkoeijen, S. (2011, April 7). *Focal adhesion kinase and paxillin : mediators of breast cancer cell migration*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16697>

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/1887/16697>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Borstkanker is een van de meest voorkomende kankersoorten waar vrouwen mee te maken kunnen krijgen. Ondanks verbeteringen in de diagnose en de behandeling van borstkanker, daalt het sterftcijfer nauwelijks. Terwijl een primaire tumor relatief ongevaarlijk is, verslechtert het optreden van uitzaaiingen of metastasen de prognose voor kankerpatienten aanzienlijk. Metastasen kunnen ontstaan doordat tumorcellen zich losmaken uit de primaire tumor en binnendringen in bloed- of lymfevaten. Vervolgens overleven de tumorcellen in deze vaten, en kunnen ze uit de vaten treden in een ander orgaan om daar een nieuwe tumor te vormen. De moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de bovengenoemde processen zijn zeer complex, en zijn vaak het onderwerp van kankeronderzoek.

De contacten die cellen maken met de extracellulaire matrix (ECM) zijn erg belangrijk voor het krijgen van overlevingssignalen. Zonder deze signalen gaan normale cellen dood. Kankercellen hebben echter vaak een defect in deze signalering en kunnen wel zonder de contacten met de ECM overleven. Bovendien hebben zij de mogelijkheid om zich te verplaatsen naar een andere plek in het lichaam door middel van cel migratie. De contacten met de ECM worden verzorgd door complexen van eiwitten die focal adhesions heten en deze focal adhesions zijn ook betrokken bij het proces van cel migratie. In het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gekeken naar de rol van twee belangrijke focal adhesie eiwitten, focal adhesie kinase (FAK) en paxillin, in borstkankercel migratie *in vitro* en *in vivo*.

In hoofdstuk 1 wordt uitgelegd wat borstkanker is, hoe het wordt geclassificeerd en hoe het wordt behandeld. Vervolgens worden de grootste moeilijkheden in de behandeling van borstkanker besproken: resistentie tegen antikanker medicijnen en het ontstaan van metastasen, alsmede de verschillende manieren waarop hiernaar onderzoek gedaan kan worden. De signaaltransductie paden die betrokken zijn bij bovengenoemde processen worden toegelicht en daarna wordt dieper ingegaan op de focal adhesions en de signaling die daarvandaan plaatsvindt. FAK en paxillin worden dan uitgebreid behandeld. Van beide eiwitten worden de structuur, de signaling en de rol in (het ontstaan van) kanker besproken.

Om onderzoek te doen naar het ontstaan van metastasen, zijn experimentele modellen erg belangrijk. Er zijn verschillende modellen beschikbaar: modellen die gebruik maken van borstkanker cellijnen (*in vitro* modellen) en modellen die de biologie van kanker bestuderen in een muis of een rat (*in vivo* modellen). In hoofdstuk 2 wordt beschreven hoe een bestaand *in vivo* model geoptimaliseerd is. Het model maakt gebruik van de borstkanker cellijn MTLn3 die is geïsoleerd uit een rat. Deze cellijn kan gebruikt worden voor *in vitro* studies, maar de cellen kunnen ook geïnjecteerd worden in ratten om te kijken naar *in vivo* effecten. Het terugspuiten van de cellen kan op twee verschillende

manieren: in het borstweefsel en in de staartvene. Wanneer de cellen in het borstweefsel worden ingespoten, ontstaat er op die plek een primaire borsttumor. Als de cellen in de staartvene worden ingespoten, gaan ze via de bloedbaan door het lichaam van de rat en lopen ze vast in de kleine haarvaatjes van de longen. Daar treden ze uit, en vormen ze in de longen experimentele metastasen. Uit ons onderzoek bleek echter dat de MTLn3 cellen in de bloedbaan al snel gedood werden door cellen van het immuunsysteem. Er is uitgezocht welke cellen van het immuunsysteem verantwoordelijk waren voor het doden van de MTLn3 cellen; dit bleken natural killer (NK) cellen te zijn. Door de ratten op de drie opeenvolgende dagen voor het inspuiten van de tumorcellen te behandelen met een antilichaam dat de NK cellen bindt en inactief maakt, wordt het mogelijk gemaakt dat de tumorcellen onverstoorde via de bloedbaan naar de longen kunnen gaan om daar uit te groeien tot metastasen. Er is op deze manier een model gecreëerd waarin gekeken kan worden naar de rol van focal adhesion eiwitten in het ontstaan van borstkanker metastasen in de longen.

FAK is een kinase, wat betekent dat het eiwit in staat is andere eiwitten te beïnvloeden door middel van fosforylering. Om de werking van FAK te remmen hebben we gebruik gemaakt van een ander eiwit, genaamd FAK-related non-kinase (FRNK). Dit eiwit is een stukje van FAK, maar het mist de kinase-activiteit. Heel belangrijk is dat FRNK wel op de focal adhesions kan plaatsnemen. Daardoor verstoot het FAK van die plek, en het resultaat is dat er minder FAK signaling plaatsvindt. Er is een MTLn3 cellijn gemaakt waarin FRNK op elk gewenst moment tot expressie gebracht kan worden door het toevoegen van doxycycline (conditionele expressie). In hoofdstuk 3 is ten eerste het effect van FAK remming (FRNK expressie) op processen die betrokken zijn bij de vorming van metastasen onderzocht. Hieruit bleek dat FRNK in mindere mate de groei, en in meerdere mate de migratie en de adhesie van MTLn3 cellen *in vitro* remt. FRNK expressie had geen invloed op de mate van celdood die optreedt bij het wegvallen van de contacten tussen cellen en de ECM (anoikis). Vervolgens zijn de MTLn3 cellen ingespoten in het borstweefsel van ratten. Via het drinkwater hebben bepaalde ratten doxycycline gekregen, wat in die ratten leidde tot tumorcellen met FRNK expressie. De groei van de primaire tumoren is gevolgd in de tijd. Hieruit bleek dat FRNK expressie de groei van primaire tumoren remt. Wanneer FRNK tot expressie werd gebracht in het experimentele metastase model, was er een duidelijke afname in het aantal longmetastasen te zien. Door het variëren van de start van de FRNK expressie in de tijd is ontdekt dat FAK een belangrijke rol speelt in de beginfase van het vormen van metastasen.

In hoofdstuk 4 is weer gebruik gemaakt van de MTLn3 cellen die FRNK conditioneel tot expressie kunnen brengen. In dit hoofdstuk is onderzocht wat de rol van FAK is in de resistentie van kankercellen tegen het antikanker middel doxorubicine. MTLn3 cellen zijn in het borstweefsel (primaire tumor) of in de staartvene (experimentele longmetastasen) van ratten ingespoten en na negen

dagen is begonnen met de expressie van FRNK. Vervolgens zijn de ratten eenmalig behandeld met doxorubicine. Omdat FRNK pas tot expressie wordt gebracht wanneer de tumoren al gevormd zijn, heeft deze expressie alleen geen effect op primaire tumorgrootte of aantal longtumoren. Ook doxorubicine behandeling alleen heeft geen effect. FRNK expressie in combinatie met doxorubicine behandeling geeft echter een spectaculaire daling van zowel primaire tumorgrootte als het aantal longtumoren. Om erachter te komen welke genen een rol zouden kunnen spelen in de verminderde resistentie van MTLn3 cellen die FRNK tot expressie brengen tegen doxorubicine, zijn er microarray studies uitgevoerd. Hieruit bleek dat FRNK expressie in MTLn3 cellen leidt tot verminderde expressie van een transcriptiefactor genaamd Fra-1. Deze transcriptiefactor is betrokken bij borstkanker; overexpressie leidt tot cel proliferatie en migratie. Naast de expressie van FRNK, leidt ook knockdown van FAK door middel van siRNA tot een verlaging in de Fra-1 expressie. Fra-1 knockdown in MTLn3 cellen heeft geen invloed op de expressie van FAK, maar leidt wel tot meer en grotere focal adhesions, Bovendien maakt Fra-1 knockdown deze cellen gevoeliger voor behandeling met doxorubicine. Fra-1 overexpressie in cellen die FRNK tot expressie brengen maakt deze cellen juist resistenter tegen doxorubicine. Deze studies laten zien dat FAK-gemedieerde signaaltransductie de expressie van Fra-1 kan reguleren, en dat Fra-1 een rol speelt bij het bepalen van de gevoeligheid van MTLn3 cellen voor doxorubicine.

Het focal adhesion-geassocieerde eiwit paxillin staat centraal in hoofdstuk 5 en 6. Paxillin is een zogenaamd adaptor eiwit, wat betekent dat het zelf geen enzymatische activiteit heeft, maar dat het door zijn vele eiwit-eiwit interactiedomeinen, complexvorming van veel verschillende eiwitten kan verzorgen. Afhankelijk van de stimulus en de toestand in de cel, kan er vraag zijn naar verschillende complexen van eiwitten die bepaalde effecten tot stand kunnen brengen. Paxillin speelt dus een belangrijke rol bij het ontstaan van de juiste signaaltransductie op het juiste moment en op de juiste plek. Een familie van signaaltransductie routes die belangrijk zijn in de reactie van cellen op stress, is de familie van de MAP kinase pathways. In hoofdstuk 5 is gekeken naar het samenspel van paxillin en JNK, een belangrijke MAP kinase, na blootstelling aan het antikankermiddel vincristine. Vincristine beschadigt de microtubuli, belangrijke bouwstenen van het cellulaire cytoskelet. Dit heeft allerlei veranderingen tot gevolg, waaronder veranderingen in focal adhesions en cytoskelet, en het stopzetten van de celcyclus. Uiteindelijk treedt celdood (apoptose) op. In MTLn3 cellen bleek vincristine ook te leiden tot een toename in de activiteit van JNK, localisatie van JNK naar focal adhesions, fosforylering van paxillin op serine residu 178 en een modificatie van paxillin die zichtbaar is op Western blot (mobility shift), maar waarvan de oorzaak onbekend is. De fosforylering van paxillin Ser178 alsmede de onbekende modificatie kunnen geremd worden door het toevoegen van de JNK remmer SP600125, en lijken dus

JNK-afhankelijk te zijn. Ook de cytoskelet veranderingen en het opronden van de cellen worden door SP600125 geïnhibeerd. De blokkade van de celcyclus is niet afhankelijk van JNK: toevoeging van SP600125 heeft hierop geen effect. Knockdown van paxillin met behulp van siRNA leidt tot een vermindering van de vincristine-geïnduceerde toename in het aantal focal adhesions. Deze data laten zien dat er een sterke samenhang is tussen JNK activatie en paxillin enerzijds en focal adhesie vorming en cytoskelet veranderingen anderzijds. Deze samenhang is van groot belang in de reactie van MTLn3 cellen op vincristine, en dit zou implicaties kunnen hebben voor de ontwikkeling van nieuwe antikanker geneesmiddelen die samen met microtubuli-remmers zoals vincristine gegeven zouden kunnen worden.

In hoofdstuk 6 wordt de rol van paxillin in cel migratie en metastasering onderzocht. In MTLn3 cellen leidt de epidermale groeifactor EGF, die ook sterk betrokken is bij borstkanker, tot activatie van JNK, fosforylering van paxillin Ser178 en een toename in random cel migratie. In MTLn3 cellen die een mutant van paxillin to expressie brengen waarin serine 178 niet gefosforyleerd kan worden (paxillinS178A), leidt EGF niet meer tot toegenomen cel migratie. De MTLn3-paxillinS178A cellen hebben een sterk afgenomen dynamiek van de focal adhesions, en deze cellen zijn ook defect in de zogenaamde wound healing: het herstellen van een gemaakte wond. Wanneer MTLn3-paxillinS178A cellen bij muizen worden ingespoten, is er een sterke afname van het aantal longmetastasen te zien, vergeleken met muizen die MTLn3-paxillin wildtype cellen ingespoten hebben gekregen. Uit microarray data blijkt dat de paxillinS178A cellen een verlaagd expressie niveau van de receptor voor EGF (EGFR) hebben. Wanneer de EGFR in deze cellen tot re-expressie wordt gebracht, herstelt zich het vermogen van deze cellen om te migreren en om metastasen te vormen in het muizenmodel. Met dit model wordt duidelijk dat er een sterke relatie is tussen paxillin-JNK signaling en EGF-gemedieerde migratie.

Uiteindelijk worden alle data in hoofdstuk 7 bediscussieerd en ingebed in recente literatuur. Samengevat laat het onderzoek beschreven in dit proefschrift zien dat zowel FAK als paxillin een belangrijke rol speelt in de regulatie van focal adhesie dynamiek. Deze dynamiek is van groot belang in het bepalen van de migratie capaciteit van cellen, en is daardoor mede bepalend voor het metastaseringsgedrag van (borst)kankercellen. Het verder ontrafelen van de processen die betrokken zijn bij cel-ECM adhesie, zal een bijdrage leveren aan het beter begrijpen van migratie en metastasering van borstkanker, en dit zal mogelijk en hopelijk leiden tot verbeteringen in zowel de behandeling als de voorkoming van borstkanker metastasering.