



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Computational modeling of cellular dynamics in tumor cell migration

Burger, G.A.

Citation

Burger, G. A. (2022, November 30). *Computational modeling of cellular dynamics in tumor cell migration*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3492187>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3492187>

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

Nederlandse samenvatting

Kanker is de op een na belangrijkste doodsoorzaak wereldwijd, en heeft in veel westerse landen, waaronder Nederland, hart- en vaatziekten ingehaald als belangrijkste doodsoorzaak. Ondanks de belangrijke progressie die er de afgelopen decennia is gemaakt in vroege opsporing en behandeling van kanker, zijn we nog steeds ver verwijderd van een volledig begrip van, in het bijzonder, het proces van metastase of uitzaaiing, wat kanker zo dodelijk maakt. Epitheliale-mesenchymale plasticiteit (EMP) speelt waarschijnlijk een belangrijke rol in metastase, waarbij de voorwaartse epitheliale-mesenchymale transitie (EMT) het mogelijk maakt dat kankercellen losbreken van de primaire tumor en het omringende weefsel en vaatstelsel binnendringen (*invasie* en *intravasatie*), en de achterwaartse mesenchymale-epitheliale transitie (MET) het mogelijk maakt dat er een secundaire tumor op een andere plek wordt gevormd (*kolonisatie*). Ondanks dat tumors verrassend veel zogeheten circulerende tumor cellen (CTCs) veroorzaken in het vaatstelsel, zijn verreweg de meeste van deze CTCs niet in staat de circulatie te overleven en uiteindelijk een uitzaaiing te veroorzaken, waardoor metastase minder vaak optreedt dan wellicht op basis van het aantal CTCs verondersteld zou kunnen worden. In de afgelopen jaren is steeds duidelijker geworden dat EMT niet een 'alles-of-niets' proces is, maar dat cellen een hybride fenotype kunnen aannemen met zowel epitheliale als mesenchymale eigenschappen, en dat juist deze hybride cellen clusters van CTCs kunnen vormen die een wel 100-voudige potentie hebben om een uitzaaiing te veroorzaken. Het is dus van groot belang de mechanismes die ten grondslag liggen aan EMP beter te begrijpen, en in dit proefschrift doen we dat door middel van het ontwikkelen en analyseren van wiskundige en computationele modellen.

Om te beginnen hebben we in **Hoofdstuk 2** verschillende computationale benaderingen met betrekking tot EMP onderzoek geïnventariseerd en samengevat. Regulatie van EMP is enorm complex en afhankelijk van honderden verschillende factoren, maar uiteindelijk komen deze factoren uit op een netwerk van zogeheten EMT transcriptie factoren (EMT-TFs) die epitheliale eigenschappen onderdrukken en mesenchymale eigenschappen induceren. Computationale modellen van EMP kunnen daarom grofweg in twee groepen ingedeeld worden: (1) kwantitatieve modellen die een klein aantal factoren bevatten, typisch op basis van 'gewone' differentiaalvergelijkingen (*ordinary differential equations*, ODEs), en (2), meer kwalitatieve (vaak Booleaanse) modellen die meer factoren meenemen. De eerste groep bevat bijvoorbeeld ODE modellen van het zogeheten 'kern'-netwerk van EMT, bestaande uit EMT-TFs SNAIL1 en ZEB1. SNAIL1 en ZEB1 zijn onderdeel van de SNAIL, TWIST, en ZEB families van 'kern'-EMT-TFs, factoren die een centrale rol spelen tijdens EMT in verschillende biologische contexten. In de tweede groep worden dit kernnetwerk gewoonlijk uitgebreid met meer TFs en andere factoren, waarbij het gebrek aan gedetailleerde parameterkennis een meer discrete benadering noodzakelijk maakt. In onze literatuurreview beschrijven we hoe modellen uit beide groepen hebben bijgedragen aan een verbeterd begrip van EMP-regulatie, en ook gebruikt zijn om de relatie van EMP met andere kenmerkende

eigenschappen van kanker te bestuderen. Daarbij is opvallend dat de relatie tussen EMP en immuuevasie relatief weinig aandacht van modelleers heeft gehad.

In **Hoofdstuk 3** ontwikkelen we daarom een ODE-model van de interactie tussen EMP en een door PD-L1 gemedieerde immuuevasie. PD-L1 op de tumorcel bindt met PD-1 op immuuncellen en dit 'immuun checkpoint' blokkeert zo het immuunsysteem in het aanvallen van de tumorcel. PD-1/PD-L1 checkpointremmers zijn succesvol gebleken bij het behandelen van verschillende kankersoorten, maar geven geen respons bij een substantieel aantal patienten, of slechts een tijdelijke respons. Een beter begrip van de mechanismen die invloed hebben op de PD-L1-expressie van tumorcellen is daarom noodzakelijk. We bestuderen de interactie tussen EMP en PD-L1-expressie door middel van het koppelen van een bestaand 'kern'-model van EMT op basis van SNAIL1 en ZEB1 met een door ons ontwikkeld model van IFN γ -geïnduceerde PD-L1 expressie. Het door ons gebruikte EMT-model is tristabiel, wat wil zeggen dat er drie stabiele evenwichten zijn met een lage, middelmatige, en hoge ZEB1-expressie voor respectievelijk een epitheliaal, hybride, en mesenchymaal fenotype. Analyse van het gecombineerde model laat zien dat deze tristabiliteit door de koppeling ook tot uiting komt in de expressie van PD-L1, waarbij er lage PD-L1-expressie is voor een epitheliaal, middelmatige expressie voor een hybride, en hoge expressie voor een mesenchymaal fenotype. Daarnaast blijkt uit onze resultaten ook dat deze koppeling EMT niet alleen waarschijnlijker maakt, maar dat deze ook sneller verloopt. We concluderen dat via deze mechanismes EMT kan bijdragen aan immuuevasie, en ook dat tumorcellen door aanwezigheid van een immuunrespons een hogere kans hebben om EMT te ondergaan.

In **Hoofdstuk 4** bestuderen we een alternatief aangedragen netwerk voor EMP-regulatie op basis van complementaire expressie van SNAIL1 en PRRX1. Eerdere experimenten lieten zien dat deze EMT-TFs na elkaar werden geactiveerd en een complementaire rol hadden in het EMT proces: Eerst zorgde Snail1, een sterke transcriptie-onderdrukker, voor verlies van epitheliale eigenschappen, waarna opkomst van Prrx1, een transcriptie-promotor, EMT voortzette door acquisitie van mesenchymale eigenschappen. We hebben eerst een gegeneraliseerd ODE-model ontwikkeld van dit netwerk wat we daarna hebben gecalibreerd aan experimentele data van EMT-TFs en EMT-markers in de MDCK (NBL-2) cellijn. Hieruit komt naar voren dat het aangedragen model alleen de experimentele data kan verklaren met toevoeging van een SMAD-GLI relais, die nodig is om de dynamiek bestaande uit twee golven van Snail1 te verklaren. Verder blijkt uit onze analyse dat Prrx1 inderdaad een meer potente mesenchymale promotor is dan Snail1; in het bijzonder wordt expressie van de mesenchymale marker ACTA2 volledig verklaard door Prrx1. Ons model verschaft dus inzicht in de rol van Prrx1 gedurende EMT, en kan gebruikt worden om het belang van deze factor tijdens EMT verder te onderzoeken.

Een kenmerkende eigenschap van EMT is de acquisitie van een migrerend fenotype, wat van groot belang is tijdens verschillende stappen van metastase. In **Hoofdstuk 5** bestuderen we het celgedrag van HCC38 en Hs578T, twee snel migre-

rende en invasieve triple-negatieve borstkanker (TNBC) cellijnen. Door middel van analyse van celmigratie-experimenten laten we zien dat met toenemende celdichtheid HCC38 cellen sneller en meer persistent (richtingsvast) gaan migreren, en dat op lage dichtheid deze cellen clusters vormen. Met behulp van simulaties met het zogenaamde cellulaire Potts model (CPM) laten we zien dat eerder gepubliceerde CPM modellen dit geobserveerde HCC38 gedrag niet kunnen verklaren. Omdat we in de experimenten veel activiteit van pseudopods observeren, implementeren we realistische pseudopod-gedreven persistentie, waarbij cellen dendrietachtige uitsteeksels vormen en zich voortbewegen in de richting van deze uitsteeksels. Met dit model kunnen we zowel het clusteren als de geobserveerde snelheids- en persistentieverandering kwalitatief reproduceren, alhoewel er op hogere dichtheid geen clustervorming is in de experimenten en wel in de simulaties. Dit kan erop duiden dat er op hogere dichtheid minder celceladhesie is. Gezien de hoge expressie van Vimentin, een mesenchymale marker, is clustervorming in HCC38 op zichzelf al verrassend omdat clustervorming een eigenschap is die typisch hoort bij een hybride fenotype. Het lijkt erop dat HCC38 inderdaad een hybride cellijn is, mede vanwege hoge expressie van EpCAM, een epitheliale marker, die opvallend genoeg geassocieerd is met de vorming van uitsteeksels, en deze directe link tussen EMP en migratiegedrag verdient verder onderzoek.

Als laatste vatten we in **Hoofdstuk 6** onze bevindingen samen, plaatsen deze in context van recent onderzoek naar EMP, en schetsen we mogelijke richtingen voor vervolgonderzoek. Gezien de complexiteit van EMP is er urgente behoefte aan *single-cell* transcriptoom- and proteoomdata voor ontwikkeling en validatie van betere computationele modellen van EMP-regulatie, maar gelukkig genereren de huidige modellen ook al mogelijke therapeutische doelwitten om kankerprogressie tegen te kunnen gaan.

In het algemeen draagt dit proefschrift bij aan inzicht in de onderliggende mechanismes van EMP. Daarmee laten we zien dat mathematisch en computationeel onderzoek een waardevolle, en soms zelfs onmisbare, rol heeft in aanvulling op experimenteel onderzoek naar EMP.