*Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)*
*http://dare.uva.nl/document/72886*

| | |
|---|---|
| File ID | 72886 |
| Filename | Samenvatting |

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

| | |
|---|---|
| Type | Dissertation |
| Title | Chemokine receptor signals: role in migration, invasion and cancer metastasis |
| Author | I.S. Zeelenberg |
| Faculty | Faculty of Medicine |
| Year | 2004 |
| Pages | 135 |

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/203016

*Copyright*

*It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use.*

*UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)*

# Samenvatting

# Samenvatting

Metastasering, de verspreiding van kankercellen in het lichaam, is de voornaamste doodsoorzaak van kanker. Het uitzaaiingsproces bestaat uit een aantal stappen. Kankercellen maken zich eerst los van de primaire tumor en komen in de bloed- of lymfevaten terecht. Verderop in het lichaam treden ze weer uit de circulatie om in een ander orgaan te invaderen, waar ze een secundaire tumor vormen. Een gedeelte van dit metastaserings-proces, het binnendringen van een ander weefsel, lijkt op het uittreden van een witte bloedcel uit een bloedvat om een ontstoken gebied binnen te gaan. Deze beweging wordt gereguleerd door kleine eiwitten, die chemokines (chemoattractant cytokines) worden genoemd. Chemokines worden geproduceerd in ontstoken weefsels, maar sommigen zijn ook continu aanwezig in de meeste organen. Onze hypothese in het begin van dit onderzoeksproject was dat de uitzaaiing van kankercellen ook gestuurd wordt door deze chemokines. Het eerste doel van het onderzoek, dat beschreven wordt in dit proefschrift, was het aantonen van de rol van een chemokinereceptor bij de uitzaaiing van T-cellymfomen (tumoren ontstaan uit bloedcellen). Ten tweede hebben we de signaleringsprocessen bestudeerd, die geactiveerd worden door chemokines en nodig zijn voor de uitzaaiing van lymfomen. Het laatste doel was om uit te zoeken of chemokinereceptoren ook betrokken zijn bij de metastasering van carcinomen en, als dat zo is, welke signaleringsprocessen daarbij een rol spelen.

In **hoofdstuk 1** wordt een algemene introductie gegeven over chemokines. Chemokines binden aan 7-transmembraan G-eiwit-gekoppelde receptoren. Alle chemokinereceptoren worden kort besproken, maar de nadruk wordt gelegd op CXCR4 en CXCR5. Signaleringsprocessen, die geactiveerd worden door chemokines, worden beschreven. De normale fysiologische functie van de chemokines wordt besproken, maar ook hun rol in ziektes zoals AIDS en kanker. Bij de ziekte kanker zijn de chemokines niet alleen betrokken bij de uitzaaiing, maar ook bij het infiltreren van witte bloedcellen in de tumor en bij angiogenese, het vormen van bloedvaten in de tumoren.

Het doel van het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 2** was om aan te tonen dat een bepaalde chemokinereceptor, CXCR4, betrokken was bij de uitzaaiing van T-cellymfomen. Als model gebruikten we een T-celhybridoma, die gemaakt was door een niet-invasief lymfoom te fuseren met invasieve geactiveerde T-cellen. De T-celhybridomacellen metastaseren naar verschillende weefsels. Deze uitzaaiing kan geblokkeerd worden door een remmer van $G_i$-eiwitten, waaruit blijkt dat een G-eiwit-gekoppelde receptor een rol speelt, en we namen aan dat het een chemokinereceptor was. De belangrijkste kandidaat was CXCR4, aangezien deze receptor aanwezig is op de T-celhybridomacellen. CXCR4 bindt aan het chemokine CXCL12, dat aanwezig is in de organen, waar de cellen metastasen vormen. Om cellen te maken zonder CXCR4, is een "intrakine" methode gebruikt: het chemokine CXCL12, verlengd met vier aminozuren, KDEL, die een endoplasmatisch reticulum (ER) retentiesignaal vormen, werd tot expressie gebracht in de hybridoma. Deze CXCL12-KDEL wordt vastgehouden in het ER door de KDEL-receptor. CXCL12-KDEL bindt ook aan CXCR4, dat daarom ook vastgehouden wordt in het ER, zodat de cellen geen CXCR4 op hun oppervlakte hebben. Deze cellen bewegen inderdaad niet meer in de richting van een hogere concentratie van CXCL12, maar wel in de richting van een ander chemokine, CCL17, dat bindt aan een andere chemokine receptor, CCR4. De cellen kunnen ook niet meer invaderen in fibroblastenmonolagen, die we gebruiken als een in vitro model voor de invasie van deze cellen in weefsels in vivo. Bovendien worden geen metastasen gevonden in muizen, die geïnjecteerd werden met deze cellen. Deze resultaten tonen aan dat CXCR4 een essentiële rol speelt bij de uitzaaiing van T-cellymfomen.

De uitzaaiing en invasie die geïnduceerd wordt door het chemokine CXCL12, is een complex proces, dat verdeeld kan worden in twee afzonderlijke stappen. Eerst wordt door het chemokine een signaal geïnduceerd, dat resulteert in de activering van het integrine LFA-1. Vervolgens bindt dit geactiveerde LFA-1 aan ICAM-1, hetgeen leidt tot een tweede signaal, waardoor meer LFA-1 moleculen worden geactiveerd. Voor het eerste signaal zijn $G_i$ eiwitten nodig en voor het tweede signaal de tyrosine kinase ZAP-70. In **hoofdstuk 3** laten we zien dat een ander G-eiwit, $G_{q/11}$, ook betrokken is bij het eerste signaal. Bovendien zijn de kleine GTPases Cdc42 en RhoA ook nodig voor de activering van LFA-1 door het chemokine CXCL12. Cdc42 is ook nodig voor de beweging van cellen naar hoge concentraties chemokine, die niet afhankelijk is van de activering van LFA-1. Opmerkelijk is dat actine-myosine contractie alleen nodig is voor de activering van LFA-1 door het chemokine signaal en niet door het tweede versterkende signaal.

De α-ketens van de G-eiwitten spelen een belangrijke rol bij de migratie en invasie, zoals hierboven beschreven is. De Gβγ-dimeer kan echter ook migratie bevorderen aangezien deze phospholipase C (PLC) en phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) kan activeren. Deze signaalmoleculen zijn beide nodig voor de migratie en invasie van de T cel hybridoma. De Gβγ-dimeer kan echter ook verzwakking van het signaal veroorzaken door desensitisering en internalisering van de receptor te induceren. In **hoofdstuk 4** blokkeren we de functie van de Gβγ-dimeer in de T-celhybridoma. We laten zien dat dit leidt tot verhoogde migratie en invasie door verminderde desensitisering en internalisering van de receptor. Dit betekent dat de Gβγ-dimeer niet nodig is voor de activering van PLC en PI3K. PLC kan ook geactiveerd worden door de α-keten van $G_{q/11}$, die betrokken is bij de CXCL12-geïnduceerde migratie. Het was opvallend dat de migratie van de Gβγ-geblokkeerde cellen onafhankelijk was van PI3K, terwijl de migratie van de cellen, waarin de Gβγ-dimeer niet geblokkeerd was, wel sterk geremd werd door PI3K remmers. Dit toont aan dat PI3K niet essentieel is voor migratie, zoals door anderen was geponeerd, op basis van resultaten verkregen met andere celtypen. In de hybridoma cellen is PI3K alleen nodig wanneer het CXCR4 signaal snel gedesensitiseerd wordt.

Bewegende cellen vertonen intense fusie van blaasjes (vesicles) met de membraan aan de voorkant van de cellen. Dit wordt nodig geacht voor de aanvoer van extra membraan, nodig voor het vormen van uitstulpingen, en ook voor de aanvoer van signaalmoleculen. De fusie van blaasjes wordt geregeld door SNAREs. Een v-SNARE op het membraan van het blaasje gaat een interactie aan met twee t-SNAREs op het membraan, waar het mee moet fuseren. In zenuwcellen is de fusie van blaasjes met neurotransmitter geblokkeerd, zodat de blaasjes gekoppeld blijven aan het membraan, wachtend op een calcium signaal. Het binnenstromen van calcium leidt dan onmiddellijk tot de fusie van de blaasjes, die gereguleerd wordt door de calcium-sensor synaptotagmin. Gezien de buitengewoon snelle reactie op chemokines, is onze hypothese dat de blaasjes, die nodig zijn voor de migratie, ook aan het membraan gekoppeld moeten zitten. We stellen voor dat de fusie van deze blaasjes met het membraan ook gereguleerd wordt door synaptotagmin en onmiddellijk gebeurt na stimulatie. In **hoofdstuk 5** laten we zien dat de T-celhybridoma inderdaad de calcium-sensor synaptotagmin tot expressie brengt. Als de functie van synaptotagmin geblokkeerd is, is de migratie compleet geremd. Bovendien leidt overexpressie van synaptotagmin tot verhoogde migratie, wat er op wijst dat de hoeveelheid endogeen synaptotagmin een limiterende factor is. Tot slot vinden we complexen van v- en t-SNAREs in de T-celhybridoma. Aangezien zulke complexen gevormd worden wanneer blaasjes gekoppeld zijn aan het membraan, betekent dit resultaat dat gekoppelde blaasjes aanwezig zijn. De complexen ontbinden wanneer fusie wordt geïnduceerd door het binnenstromen van calcium, maar ook na stimulatie met het chemokine CXCL12. We stellen voor dat fusie van membraan-gekoppelde blaasjes, gereguleerd door de calcium-sensor synaptotagmin, essentieel is voor chemokine-geïnduceerde migratie.

In de laatste twee hoofdstukken richten we ons op een ander tumorceltype, coloncarcinoom (kanker van de dikke darm). In **hoofdstuk 6** laten we zien dat de chemokinereceptor CXCR4 ook essentieel is voor de metastasering van dit tumortype. De rol van CXCR4 is echter duidelijk anders dan bij de uitzaaiing van de T-celhybridoma. In tegenstelling tot de T-celhybridoma hangt de metastasering van het coloncarcinoom niet af van $G_i$ eiwitten, die nodig zijn voor CXCR4-geïnduceerde migratie en invasie. Bovendien is de hoeveelheid CXCR4 op de coloncarcinoomcellen in vitro erg klein, terwijl de T cel hybridoma CXCR4 continu tot expressie brengt. De hoeveelheid CXCR4 op de coloncarcinoomcellen wordt echter in vivo sterk verhoogd, maar pas nadat de cellen de weefsels zijn binnengedrongen. Daarom concluderen we dat CXCR4 niet nodig is voor de invasie, maar pas in een later stadium, zeer waarschijnlijk om de groei van de tumorcellen te bevorderen. De CXCR4-deficiënte cellen kunnen inderdaad wel de longen infiltreren in dezelfde mate als cellen met CXCR4. Ze kunnen ook overleven, maar groeien niet uit, terwijl de onveranderde coloncarcinoomcellen, met CXCR4, wel snel grote metastasen vormen. Dit suggereert dat CXCR4-remmers mogelijk gebruikt kunnen worden als anti-kanker middel om de uitgroei van micrometastasen te onderdrukken.

In **hoofdstuk 7** beschrijven we de verrassende waameming dat de chemokinereceptor CXCR5 tot expressie komt in coloncarcinoomcellen. Dit is opvallend aangezien CXCR5 tot nu toe alleen gevonden was op lymfocyten. Net als voor CXCR4, zoals beschreven in hoofdstuk 6, is de hoeveelheid CXCR5 op de cellen in vitro erg klein, maar in vivo sterk verhoogd. De rol van deze

chemokinereceptor bij metastasering moet nog vastgesteld worden, maar we vonden wel dat het chemokine dat bindt aan deze receptor, CXCL13, de groei kan bevorderen van coloncarcinoomcellen, die CXCR5 tot expressie brengen. Bovendien vonden we dat CXCL13 aanwezig is in de metastasen, zodat het mogelijk de groei van de uitgezaaide tumorcellen kan bevorderen.

De resultaten beschreven in dit proefschrift tonen aan dat de chemokinereceptor CXCR4 en CXCL12, het chemokine dat aan CXCR4 bindt, een essentiële rol spelen bij de uitzaaiing van T-cellymfomen, maar ook van coloncarcinomen. CXCR5 en CXCL13 zouden ook de groei kunnen bevorderen van coloncarcinoom-metastasen, maar dit moet nog aangetoond worden. Verder zijn signaleringsstappen opgehelderd, hetgeen bijdraagt aan een beter begrip van het complexe proces van het uitzaaien van tumorcellen. Onze resultaten suggereren dat verschillen in metastasering tussen individuele tumoren verklaard kunnen worden door verschillen in expressie van deze chemokinereceptoren en/of de vele signaaleiwitten. Deze receptoren en signaaleiwitten zijn potentiële doelwitten voor therapie.