

# VU Research Portal

## Galectins as targets for angiostatic cancer therapy

Schulkens, I.A.E.

2015

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Schulkens, I. A. E. (2015). *Galectins as targets for angiostatic cancer therapy*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# **Samenvatting**

**Galectines als targets voor anti-angiogene  
kankertherapie**

## Samenvatting

Galectines vormen een familie van eiwitten die bestaan uit een geconserveerd domein waarmee suikerketens herkend kunnen worden op geglycosyleerde eiwitten en lipiden. Ontregeling van galectines kan bijdragen aan diverse ziektebeelden, waaronder kanker. Bepaalde galectines hebben prognostische en therapeutische waarde in verscheidene soorten kanker. Onderzoek heeft aangetoond dat galectines verschillende stappen van tumorprogressie kunnen beïnvloeden, zoals tumorceltransformatie, uitzaaiingen en het omzeilen van het immuunsysteem. Daarnaast spelen galectines een rol bij de groei van nieuwe bloedvaten uit reeds bestaande haarvaatjes, een proces dat angiogenese wordt genoemd. Tumoren induceren angiogenese om te kunnen blijven groeien. Door angiogenese wordt de tumor namelijk van nieuwe bloedvaten voorzien, waardoor het transport van voedingsstoffen, cellen en bloedgasen kan plaatsvinden. Hierdoor kan de tumormassa toenemen en via de nieuwe bloedvaten kunnen tumorcellen uitzaaien. Het remmen van angiogenese wordt daarom gezien als een veelbelovende manier om kanker te behandelen. De cellen die verantwoordelijk zijn voor de bloedvatgroei zijn endotheelcellen (EC). Deze cellen bekleden de binnenste laag van de bloedvatwand. Ze zijn genetisch zeer stabiel en ze zijn gemakkelijk bereikbaar voor medicijnen via het bloed. Dit alles maakt EC aantrekkelijke doelwitten voor anti-angiogene therapie, i.e. het remmen van angiogenese. Recent onderzoek heeft laten zien dat galectines in de endotheelcellen van tumorbloedvaten mogelijkheden bieden voor het remmen van angiogenese. Van de 15 galectines die voorkomen in zoogdieren, komen alleen galectine-1, -3, -8 en -9 tot expressie in het humane endotheel. De regulatie hiervan hangt samen met de activiteit van endotheelcellen, waaruit blijkt dat galectines een rol spelen in angiogenese. De huidige kennis met betrekking tot de expressie en functie van galectines in endotheelcelbiologie en angiogenese, evenals de mogelijkheden om galectines te targeten, zijn samengevat in **hoofdstuk 1**.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek had als doel om de prognostische waarde van galectines in kankerpatiënten verder te bepalen. Tevens hebben we de expressie en functie van galectines in endotheelcellen verder onderzocht. Ten slotte hebben we methodes onderzocht om galectines therapeutisch te kunnen targeten.

Om deze onderzoeksdoelen te bereiken werden verschillende reeds bekende angiogenese technieken aangepast om de rol van galectines en galectineremmers in endotheelcelbiologie *in vitro* (**hoofdstuk 3**) en angiogenese *in vivo* (**hoofdstuk 4**) te kunnen bestuderen.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we ons onderzoek naar de prognostische waarde van alle humane galectines in patiënten met vroege stadia (I/II) van niet-kleincellige longkanker. Het is belangrijk om binnen deze patiënten diegenen te identificeren waarbij de tumor terugkeert na operatieve verwijdering, omdat deze patiënten waarschijnlijk baat hebben bij adjuvante chemotherapie. Door de galectine-expressie uitgebreid in kaart te brengen hebben wij de prognostische waarde van galectine-1 in deze patiënten bevestigd. Wij zagen namelijk dat hoge galectine-1

expressie significant correleert met zowel kortere algehele overleving als kortere ziektevrije overleving. Dit komt overeen met andere studies waarin verhoogde galectine-1 expressie werd geassocieerd met een slechtere overleving van de patiënt. Daarnaast hebben we de expressie van drie galectine-9 splicevarianten onderzocht, en hebben we galectine-9 $\Delta$ 5 geïdentificeerd als een nieuwe potentiële prognostische marker in vroege stadia van niet-kleincellige longkanker. Verhoogde expressie was geassocieerd met een betere overleving van de patiënt. Uit bovenstaande resultaten bleek ook dat de prognostische waarde van verschillende galectine-9 splicevarianten van elkaar verschilt, wat zou kunnen betekenen dat deze varianten verschillende functies hebben. Omdat galectine-9 ook tot expressie komt in het tumor endotheel, hebben we vervolgens de expressie van alle mogelijke galectine-9 varianten in endotheelcellen geanalyseerd, zoals beschreven in **hoofdstuk 5**. Uit dit onderzoek blijkt dat het galectine-9 transcript niet alleen onderhevig is aan post-transcriptionele splicing van exon 5 en 6, die coderen voor een peptide dat twee suikerbindende domeinen verbindt, maar ook van exon 10, dat codeert voor het C-terminale suikerbindende domein. Posttranscriptionele splicing van dit exon resulteert in een getrunceerd C-terminaal suikerbindend domein. Naast de drie reeds bekende galectine-9 splicevarianten (gal-9 full length, gal-9 $\Delta$ 5 en gal-9 $\Delta$ 5/6) vonden we dan ook twee additionele varianten, die naast exon 6 en/of exon 5 ook exon 10 missen (gal-9 $\Delta$ 5/10 en gal-9 $\Delta$ 5/6/10). Wij hebben aangetoond dat de expressie van deze splicevarianten verschillend is en ook verandert tijdens endotheelcelactivatie. Verder onderzoek naar de meest voorkomende vorm, gal-9 $\Delta$ 5, toonde aan dat de functie hiervan afhankelijk was van de cellulaire lokalisatie, de lokale concentratie en de context waarin het eiwit aan de cel wordt gepresenteerd. Daarnaast bleek dat gal-9 $\Delta$ 5 maar een klein remmend effect op angiogenese heeft.

In **hoofdstuk 6** beschrijven we het verdere onderzoek naar de prognostische waarde van alle galectine-9 splicevarianten, inclusief de twee nieuwe isovormen, in nierkankerpatiënten. Hierbij hebben we verhoogde gal-9 $\Delta$ 5/6 en gal-9 $\Delta$ 5/6/10 expressie geïdentificeerd als nieuwe markers voor betere overleving, wat opnieuw het belang van het onderscheiden van verschillende splicevarianten benadrukt. Bij de laatste variant, gal-9 $\Delta$ 5/6/10, is het suikerbindend domein aan de C-terminus niet compleet, wat mogelijk de functie van het eiwit beïnvloedt. Daarom hebben wij ook de effecten van het N-terminale domein (gal-9N) op endotheelcellen vergeleken met een galectine-9 waarin beide domeinen nog werkzaam zijn (gal-9 $\Delta$ 5). Vergeleken met gal-9 $\Delta$ 5 vertoonde gal-9N een sterkere remming van endotheelcelmigratie *in vitro* en angiogenese *in vivo*. Daarentegen werden endotheelcelsprouting en transwell migratie beter gestimuleerd door gal-9N. Ook hieruit blijkt weer dat de omgeving en context belangrijk zijn voor de functie van galectine-9. Verder onderzoek naar de regulatie en functionele diversiteit van verschillende splicevarianten is noodzakelijk voor de ontwikkeling van effectieve kankertherapieën die gericht zijn op galectine-9.

Naast hun waardevolle bijdrage als prognostische en diagnostische markers worden galectines ook steeds meer beschouwd als targets voor het remmen van angiogenese bij

kankerpatienten (anti-angiogene therapie). In eerder onderzoek hebben we al beschreven dat galectine-1 een target is voor het anti-angiogene peptide anginex. De structurele en functionele overeenkomsten tussen anginex en plaatjes factor 4 (CXCL4), een natuurlijk voorkomend eiwit met anti-angiogene activiteit, leidden tot de hypothese dat galectine-1 ook een target voor CXCL4 zou kunnen zijn. Het onderzoek naar deze hypothese is beschreven in **hoofdstuk 7**. We tonen aan dat CXCL4 inderdaad aan galectine-1 bindt. Als gevolg van deze interactie verandert de mate waarin galectine-1 aan bepaalde suikers kan binden. De exacte functionele relevantie van deze veranderde suikerbinding blijft tot op heden onduidelijk. We laten zien dat CXCL4 de stimulerende effecten van galectine-1 op endotheelcelproliferatie en -migratie kan neutraliseren. Of dit een gevolg is van bijvoorbeeld verminderde H-Ras signalering of verhoogde opname van galectine-1-bindende receptoren vereist verder onderzoek. Naast een effect op endotheelcellen, blijkt CXCL4 ook invloed te hebben op de door galectine-1 geïnduceerde effecten op bloedplaatjes. Zowel de door galectine-1 geïnduceerde plaatjesactivatie als plaatjesaggregatie werden versterkt door CXCL4. Mogelijk kunnen de effecten op endotheelcellen en bloedplaatjes worden verklaard door de veranderde binding aan suikers door galectine-1 na de interactie met CXCL4. Daarentegen zou het ook kunnen dat door het binden aan galectine-1 simpelweg het transport van CXCL4 wordt gefaciliteerd, bijvoorbeeld naar plaatsen van ontsteking. Anderzijds zou het ook mogelijk zijn dat galectine-1 juist de functie van CXCL4 verstoort. Hieruit blijkt duidelijk dat er meer onderzoek moet worden gedaan naar de vraag of CXCL4 ingezet kan worden om galectine-1 te remmen als anti-angiogene therapie.

In het algemeen richten anti-galectine-therapieën zich op het verstoren van de functies van galectines door gebruik te maken van antilichamen, suikers of peptides. Het veranderen van de reducerende omgeving die nodig is voor de correcte vouwing en het correcte functioneren van galectines zou echter ook mogelijkheden kunnen bieden om de eiwitactiviteit te verstoren. In **hoofdstuk 8** hebben we een begin gemaakt met het onderzoek naar een nieuwe manier om in te grijpen in de functies van galectines, namelijk door het beïnvloeden van de redox status van een cel. Metallothioneïnes (MTs) zijn kleine, cysteïne-rijke eiwitten die betrokken zijn bij o.a. de cellulaire huishouding van metalen, metaalontgiftiging en de regulatie van de cellulaire redoxbalans. Ook zijn er studies die een rol van bepaalde MTs in angiogenese beschrijven. Aangezien er zeer weinig bekend is over de expressie en functie van MTs in endotheelcellen, hebben wij de expressie van alle humane MTs in endotheelcellen bepaald. Daarbij hebben we een breed repertoire van endotheliale MTs gedetecteerd, waarvan de expressie bleek te veranderen onder invloed van o.a. hypoxie. Daarnaast hebben we een rol gevonden voor de meest voorkomende MT-isovorm (MT2A) in endotheelcelfuncties *in vitro*. Verder onderzoek moet uitwijzen of MT2A een waardevol target voor anti-angiogene therapie zou kunnen zijn en of het verstoren van MT2A inderdaad de activiteit van galectine-1 beïnvloedt.

Kortom, in dit proefschrift hebben we de kennis over de prognostische waarde van galectines in kanker verder uitgebreid en hebben we het belang van het onderscheiden

van verschillende splicevarianten onderstreept. Daarnaast hebben we nieuwe galectine-9 splicevarianten met mogelijk verschillende functies in angiogenese geïdentificeerd. Ook hebben we verschillende methodes aangedragen om de functies van galectines te verstoren. Dit alles kan mogelijk bijdragen aan het ontwikkelen van medicijnen die galectines targeten als anti-angiogene kankertherapie.

