

Samenvatting

De rol van galectines in bloedvaten

Samenvatting

Ontregeling van de groei van nieuwe bloedvaten, een proces dat angiogenese genoemd wordt, speelt een rol bij vele ziektes en is een van de kerneigenschappen van kanker. Wanneer de beperkte diffusie afstand van zuurstof niet langer volstaat om tumorcellen van zuurstof te voorzien zullen deze hypoxisch worden en dit zal leiden tot de zogenaamde *angiogene switch*, m.a.w. de verandering naar een omgeving die de groei van nieuw bloedvaten stimuleert. Tumorcellen zullen groeifactoren uitscheiden die endotheelcellen activeren en dit zal aanzet geven tot angiogenese. In eerdere studies hebben we aangetoond dat een toename in de expressie van galectine-1 in endotheelcellen noodzakelijk is voor dit proces en dat galectine-9 hoeveelheden ook veranderen in endotheelcellen die gestimuleerd worden met groeifactoren. Galectine-1 is een zogenaamde *prototype* galectine, wat wil zeggen dat het 1 suiker-bindend domein bevat terwijl galectine-9 een *tandem-repeat* galectin wordt genoemd omdat het 2 suiker bindende domeinen heeft die met elkaar verbonden zijn door een linker domein. Galectine-1 is het meeste bestudeerd en studies tonen aan dat het een rol speelt in processen in de cel, zoals het verwerken van pre-mRNAs en het medieren van ras-siginaaltransductie maar ook in processen die plaatsvinden buiten de cel, zoals het aanzetten van de VEGF receptor en het medieren van de aanhechting en het migreren van cellen. Galectine-9 speelt ook een rol in de laatste 2 processen maar er is niet veel geweten over de rol van galectine-9 in de cel. Een gegeven dat het ingewikkeld maakt om deze galectines te bestuderen is dat er alternatieve transcripten lijken te bestaan en dat er bijna niets geweten is over de functionele consequenties hiervan. Beide galectines, die zich zowel in tumorcellen als in cellen rond de tumor zoals endotheelcellen kunnen bevinden, spelen ook een rol in andere kerneigenschappen van kanker of zo'n rol is voorgesteld door onderzoekers. Dit gegeven van een rol op meerdere niveaus in tumoren leidt ertoe dat galectines worden gezien als aantrekkelijke doelwitten voor anti-kanker therapie, wat nog verder ondersteund wordt door studies die aantonen dat galectine-1 and galectine-9 expressie gebruikt kan worden als een prognostische test. In deze thesis wilden we de rol van galectine-9 in endotheelcellen dichtbij tumoren verder onderzoeken. Daarnaast wilden we ook de functie van alternatieve transcripten van zowel galectine-1 als galectine-9 verkennen en nagaan of de expressie van deze transcripten gebruikt kan worden voor prognostische doeleinden.

In **hoofdstuk 5** hebben we alle literatuur samengevat over de rol van galectine-9 in de biologie van tumoren. Verschillende studies tonen aan dat galectine-9 een rol speelt in geprogrammeerde celdood van tumorcellen en ook in de aanhechting en metastase van deze cellen. Daarnaast zijn er ook studies die aantonen dat galectine-9 krachtig het immuunsysteem kan onderdrukken, wat suggereert dat galectine-9 een rol zou kunnen spelen in het onderdrukken van de immuunrespons tegen tumoren. Ook in angiogenese zou galectine-9 een rol kunnen hebben omdat de expressie ervan verandert in endotheelcellen als deze geactiveerd worden. Over het algemeen neemt de hoeveelheid galectine-9 in tumoren af als deze verder evolueren naar een aggressievere vorm. Deze vinding lijkt moeilijk te verzoenen met een rol in het onderdrukken van de immuunrespons. Wij stellen een model voor waarbij de hoeveelheid galectine-9 in tumorcellen inderdaad daalt, maar de hoeveelheid in endotheelcellen stijgt. Zo kan er als het ware een immuunonderdrukkende barriere gevormd worden door deze endotheelcellen tussen de immuuncellen in het bloed en de tumor cellen.

Uit **hoofdstuk 4** blijkt dat dit model zou kunnen kloppen want in 4 verschillende kankertypes, namelijk borst, long, lever en nierkanker, tonen wij aan dat de hoeveelheid galectine-9 in endotheelcellen rond tumoren inderdaad veel hoger is dan op andere plekken in het lichaam van

kankerpatienten. We konden maar een beperkte rol voor galectine-9 in angiogenese aantonen in een zogenaamd 'levend' CAM model, wat ons ertoe aanzette om de immuunsysteem-onderdrukkende eigenschappen van galectine-9 te onderzoeken. Wanneer we galectine-9 toevoegen aan mononucleaire bloedcellen leidt dat tot geprogrammeerde celdood van immuuncellen die tumoren kunnen aanvallen, namelijk helper T cellen en cytotoxische T cellen, maar niet van cellen die het immuunsysteem temperen zoals regulerende T cellen. Of de hoeveelheid galectine-9 in endotheelcellen rond de tumor inderdaad overeenkomt met de infiltratie van immuuncellen in deze tumoren wordt nagegaan in volgende studies, alsook of er meer afstoting van tumoren optreedt in muizen die geen galectine-9 in hun endotheelcellen hebben.

Zoals we reeds vermelden zijn er alternatieve transcripten van galectine-9, wat wil zeggen dat na transcriptie exonen 5, 6 en 10 uit het transcript geknipt kunnen worden door gespecialiseerde enzymen wat leidt tot verschillende galectine-9 varianten. Exon 5 en 6 coderen voor het linker domein, terwijl exon 10 codeert voor het tweede suiker-bindende domein van galectine-9. Tot nu toe is er enkel galectine-9 Δ 5, de meest voorkomende variant, beschikbaar om aan te kopen, wat studies naar de functie van deze varianten moeilijk maakt. Een techniek genaamd qPCR laat ons wel toe om specifiek galectine-9 varianten te detecteren en via deze techniek hebben we aangetoond dat endotheelcellen 5 galectine-9 varianten aanmaken die verschillend veranderen wanneer endotheelcellen geactiveerd worden. Deze techniek heeft ook geleid tot een samenwerken met een groep die onderzoek doet naar de cellulair veranderingen die plaatvinden bij problemen omtrent zwangerschap. In **hoofdstuk 3** laten we zien dat de expressie van galectine-9 toeneemt in deciduale cellen in een muismodel voor normale zwangerschap. Deze toename was echter niet zo duidelijk in een muismodel voor spontane abortie, waardoor wij voorstellen dat in dit model de balans tussen T helper cellen van het type 1 en het type 2 verstoord is alsook de activatie van NK cellen. Mits verdere studies, zou dit de verstoorde angiogenese bij spontane abortie kunnen verklaren. We konden ook aantonen dat de verandering van de hoeveelheid galectine-9 komt door de verandering van de hoeveelheid van specifieke varianten van galectine-9. Het lijkt er zelfs op dat de hoeveelheid van galectine-9 Δ 5/10 als prognostische test kan gebruikt worden om te voorspellen of er problemen met de zwangerschap zullen optreden. De techniek om specifiek galectine-9 varianten aan te tonen d.m.v. qPCR werd ook gebruikt in een studie beschreven in **hoofdstuk 2**, waarbij we keken naar de expressie van deze varianten in weefsels van NSCLC patienten. We konden aantonen dat het niveau van gal-9 Δ 5 expressie prognostisch is in NSCLC. Zowel een lage expressie van gal-9 Δ 5 als een combinatie van een lage gal-9 Δ 5 expressie met een hoge galectine-1 expressie duiden op een slechte prognose bij deze kanker.

Naast studies die alternatieve transcripten van galectine-9 beschrijven is er in 2001 ook 1 studie gepubliceerd waarin aangetoond wordt dat er 2 verschillende galectine-1 transcripten zijn in de muis. In tegenstelling tot bij galectine-9 worden deze transcripten niet aangemaakt voor het uitknippen van exonen maar door een verschil in startplaats van transcriptie van het galectine-1 gen waardoor er een lang transcript is, GAL-1L, dat 31 extra bases heeft aan het 5' uiteinde van het transcript vergeleken met het korte transcript, GAL-1S. Drie elementen die het galectine-1 gen aansturen werden beschreven in deze studie en wij tonen aan dat deze elementen inderdaad ook voorkomen in het menselijke genoom. We laten ook zien dat er inderdaad expressie van GAL-1S en GAL-1L plaatvindt in menselijke endotheelcellen en dat deze expressie verschillend veranderd wanneer endotheelcellen geactiveerd worden. De hoeveelheid van GAL-1S transcripten neemt dan namelijk toe, terwijl de hoeveelheid van GAL-1L transcripten afneemt. Daarna probeerden we te achterhalen welke gevolgen de toevoeging van 31 bases aan het 5' uiteinde heeft

en vonden dat de 5'UTR van GAL-1L stabiel vouwt in de vorm van een lus welke ons meteen deed denken aan een pri-miRNA, een voorloper RNA voor miRNAs. Dit zette ons ertoe aan om een overzicht te publiceren, in **hoofdstuk 7**, over welke miRNAs voorkomen in endotheelcellen. We konden echter geen miRNAs aantonen die uit de lus in de 5'UTR van GAL-1L ontstaan. Wel laten we in **hoofdstuk 6** zien dat er na de lus-structuur een knip plaatsvindt, waardoor er een RNA fragment ontstaat dat we ce-G1L genoemd hebben. De beschrijving van zogenaamde ceRNAs door de groep van Pandolfi inspireerde ons om een andere functie voor ce-G1L te bedenken, namelijk het wegvangen van een miRNA dat belangrijk is voor de functie van endotheelcellen, waardoor de hoeveelheid van andere doelwitten van dit miRNA verandert. Een aantal initiele experimenten suggeren dat deze hypothese wel eens zou kunnen kloppen omdat miR-296, een miRNA dat belangrijk is voor de functie van endotheelcellen, een excellente kandidaat is om door ce-G1L weggevangen te worden, maar verdere studies zijn nodig. We stellen een model voor waarin GAL-1S het transcript is dat codeert voor het galectine-1 proteïne terwijl GAL-1L een andere functie heeft. De afname van de hoeveelheid van GAL-1L transcripten en dus ook ce-G1L RNA fragmenten in endotheelcellen die geactiveerd worden, zou ertoe kunnen leiden dat er minder miRNA-296 weggevangen wordt door ce-G1L. Hierdoor zal er dus meer miR-296 kunnen binden aan andere mRNA doelwitten zoals p21 en hgs, waarvan gekend is dat ze belangrijk zijn om endotheelcellen in een rustende fase te houden. Het zou dus kunnen dat ce-G1L een soort deurwachter in de cel is die ervoor zorgt dat endotheelcellen niet foutief geactiveerd worden.

In deze thesis hebben we de kennis over de rol van galectine-9 in de biologie van tumoren verder uitgebreid en laten zien dat het belangrijk is om rekening te houden met het bestaan van verschillende transcripten van galectine-1 en galectine-9. Zowel de expressie als de functie van deze alternatieve transcripten kan namelijk erg verschillen. Deze thesis draagt bij aan een beter begrip van de biologie en de expressie-patronen van galectine-1 en galectine-9, 2 galectines die veelbelovende doelwitten voor kankertherapie zijn omdat ze verschillende rollen vervullen naarmate tumoren groeien en aggressiever worden.