



Doctoral Thesis

Role of the CXCR4/SDF-1 Chemokine Axis in Metastasis Formation in Osteosarcoma

Author(s):

Neklyudova, Olga

Publication Date:

2015

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010587057> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No 23170

**Role of the CXCR4/SDF-1 Chemokine Axis in Metastasis
Formation in Osteosarcoma**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCE of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Olga Neklyudova

Dipl. Biol. Siberian Federal University

born on 04.12.1985

citizen of Germany/Russia

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ernst Hafen, ETH Zurich

Prof. Dr. Josef Jiricny, ETH Zurich

Prof. Dr. Pancras Hogendoorn, LUMC Leiden

Prof. Dr. Bruno Fuchs, Uniklinik Balgrist, Zurich

Prof. Dr. Marcus Thelen, IRB Bellinzona

2015

Summary

Osteosarcoma (OS) is a highly malignant primary bone tumor with a high propensity for lung metastasis being the main cause of death in patients with OS. The introduction of chemotherapy in the late 70s improved the survival of OS patients with localized disease dramatically. The five-year survival rate of patients who present with metastasis at diagnosis, however, plateaued at about 20% and has not been increased since that time. Therefore, we urgently need to gain a better understanding of the molecular mechanisms underlying OS metastasis in order first to develop new efficient targeted therapies aiming at the inhibition of metastatic spread and second to improve survival and life quality of OS patients suffering from metastatic disease.

The involvement of the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in the metastatic process of various cancers has been widely investigated. It has been shown that CXCR4 positive metastatic cells migrate towards SDF-1 concentration gradient to the sites of secondary lesions. It is not clear, however, if the same mechanism applies to OS cells originating from the bone, where SDF-1 is constitutively expressed by bone marrow cells. Further, inconclusive results of the correlation between CXCR4 expression in OS samples and metastasis or patient survival have been reported. Therefore, the aim of this thesis was to investigate in more details the role of the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in OS development *in vivo* in SCID mice. In order to do so, we interfered with the SDF-1/CXCR4 chemokine signaling in CXCR4 expressing 143-B human OS cells via stable expression of native SDF-1 or its genetically modified variants, P2G or SDF-1-KDEL. P2G is a competitive SDF-1 receptor antagonist, whereas SDF-1-KDEL is a fusion protein that prevents cell surface expression of CXCR4. Empty vector carrying cells were used as a control.

Our results revealed that expression of native SDF-1 did not affect OS tumor growth, but strongly promoted metastasis, whereas local interference with SDF-1/CXCR4 interaction through P2G or SDF-1-KDEL expression in 143-B cells significantly enhanced intratibial

tumor growth and inhibited lung metastasis. Interestingly, we observed that tumors grown from P2G and SDF-1-KDEL expressing 143-B cells contained larger numbers of CXCR4 expressing tumor cells. These results were supported by the increased levels of CXCR4 encoding mRNA detected in these tumors compared to control. Apparently, CXCR4 expression in OS cells promoted tumor cell retention within primary tumors rather than metastatic dissemination, which was reflected by an increased primary tumor size and a decreased number of metastasis in P2G- and SDF-1-KDEL- tumor-bearing mice. Intriguingly, further analysis of mouse lungs revealed an enrichment in CXCR4 expressing disseminated tumor cells in all experimental groups. These findings provide evidence that SDF-1/CXCR4 signaling might be crucial for survival and proliferation of OS cells in later steps of the metastatic process, thus revealing a dual role of the SDF-1/CXCR4 pair in the metastatic cascade of OS. In conclusion, our results provide new insights into the role of the SDF1/CXCR4 chemokine pair in OS, thereby defining the basic rationale for local CXCR4 targeted anti-metastatic therapy in the lungs.

Zusammenfassung

Das Osteosarkom ist ein bösartiger primärer Knochentumor. Es verursacht Lungenmetastasen, welche die Haupttodesursache der Osteosarkompatienten sind. Nach der Einführung der Chemotherapie in den Siebzigerjahren hat sich das Überleben der Osteosarkompatienten mit einem lokalisierten Tumor dramatisch verbessert. Bei den Patienten, bei denen Metastasen festgestellt wurden, blieb die 5-Jahres-Überlebensrate unverändert bei nur 20 Prozent. Die Prognose hat sich für die Patienten mit Metastasen seitdem nicht verbessert. Um neue, effektivere und gezielte Therapieansätze zu entwickeln um die Lebensqualität der Patienten mit Metastasen zu verbessern, bedarf es eines besseren Verständnisses von den molekularen Mechanismen der Osteosarkommetastasierung.

Es wurde wissenschaftlich nachgewiesen, dass das Chemokin SDF-1 und dessen Rezeptor, CXCR4, bei der Metastasierung von verschiedenen Krebsarten involviert sind. Tumorzellen, die den Rezeptor CXCR4 haben, migrieren entlang eines Gradienten von SDF-1, das im Sekundärgewebe produziert wird. Es ist nicht klar, ob der gleiche Mechanismus bei Knochentumoren eine Rolle spielt, weil SDF-1 permanent im Knochenmark produziert wird. Die Zusammenhänge zwischen CXCR4-Expression des Primärtumors und das daraus resultierende metastatische Potential eines Osteosarkoms oder der allgemeinen Überlebensrate der Patienten, sind noch unklar. In dieser Dissertation wurden daher die Funktionen des Chemokines SDF-1 und dessen Rezeptor CXCR4 in der Pathogenese des Osteosarkoms *in vivo* in SCID Mäusen untersucht. Zu diesem Zweck haben wir humane 143-B Osteosarkomzellen manipuliert damit sie natives SDF-1 oder dessen genetisch modifizierte Formen, P2G und SDF-1-KDEL, stabil exprimieren und dadurch die Wechselwirkung zwischen SDF-1/CXCR4 unterbunden wird. P2G ist ein kompetitiver Hemmer des Chemokines SDF-1, und SDF-1-KDEL ist ein Fusionseiweiss, welches verhindert, dass der Rezeptor CXCR4 an die Zellmembran gelangt. Als passende Kontrolle haben wir auch 143-B Zellen mit einem leeren Infektionsvektor generiert.

Unsere Resultate zeigen, dass die Expression von nativem SDF-1 das Wachstum des Tumors nicht verändert hat, aber die Lungenmetastasierung stark gefördert hat. P2G und SDF-1-KDEL haben das Wachstum der primären Tumore gefördert, allerdings die Metastasierung reduziert. Wir haben auch beobachtet, dass die Tumore, die aus den 143-B P2G und 143-B SDF-1-KDEL Zellen gewachsen sind, mehr CXCR4-positive Tumorzellen aufwiesen als die Kontrolltumore. CXCR4 wurde mit Hilfe von Flusscytometrie und PCR bestimmt. Offensichtlich wurden die Osteosarkomzellen durch deren CXCR4 Rezeptor und das vom Knochenmark produzierte SDF-1 in den Primärtumoren behalten. Dadurch haben die 143-B P2G und 143-B SDF-1-KDEL Zellen grössere Primärtumore und weniger Metastasen entwickelt. Interessanterweise hat die Analyse der Mauslungen aller experimenteller Gruppen

gezeigt, dass die Metastasen mit CXCR4-positiven Tumorzellen angereichert wurden. Unsere Resultate weisen darauf hin, dass CXCR4 sehr wichtig für das Überleben der Tumorzellen in der neuen Umgebung sein könnte und dass CXCR4 eine duale Rolle im Metastasierungsprozess des Osteosarkoms spielen könnte. Schliesslich liefert unsere Studie neue Erkenntnisse über die Rolle, die SDF-1 und CXCR4 in der Pathogenese des Osteosarkoms spielen könnten und deutet an, dass eine örtliche, auf CXCR4 abgezielte Therapie eine attraktive Option darstellt.

Preface

The focus of this thesis was to investigate the role of the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in OS metastasis. The introduction part gives an overview on OS and the metastatic process and includes the description of animal models used for studying OS. CXCR4/SDF-1 chemokine biology as well as its implication in carcinogenesis is also detailed in the introduction section.

The result part is split into two parts. The first part is presented as a manuscript:

Altered CXCL12 expression reveals a dual role of CXCR4 in osteosarcoma tumor growth and metastasis

The second part contains further results that were not included in the manuscript and additional studies written as separate chapters:

- **Role of the SDF-1/CXCR4 axis in OS metastasis**
- **Pulmonary administration of an SDF-1 neutralizing ligand for targeted treatment of lung metastasis in an intratibial metastasizing OS mouse model: a pilot study**
- ***In vivo* characterization of K12 *lacZ*, K7M2 *lacZ*, and MOS-J *lacZ* OS models**