

Diss. ETH No. 20677

# **Validation of proprotein convertase furin as potential target in rhabdomyosarcoma**

A dissertation submitted to  
**ETH Zurich**  
for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

**Valentina D'Alessandro**

MSc in Genomica Funzionale, Università degli studi di Trieste  
Born April 7<sup>th</sup>, 1982  
Italian

Prof. Dr. R. Schibli, examiner  
Prof. Dr. C. Halin Winter, co-examiner  
Dr. M. Bernasconi, co-examiner

**2012**

## SUMMARY

Rhabdomyosarcoma (RMS) represents more than half of soft tissue sarcomas in children. Common treatment includes surgery, chemotherapy and radiotherapy but, unfortunately, resistance to conventional chemo- and radiotherapy is observed and potential long lasting side effects can appear even many years later. For this reason, improvement of therapy with a more targeted approach is a main goal for clinical application.

By panning of a phage displayed random peptide library on RMS cell lines and xenograft, we were able to select a peptide, named RMS-P3, with high affinity for RMS *in vitro* and *in vivo*. An alanin-scan *in vitro* allowed the identification of the essential binding motif RX(R/K)(R/K) known to be the cleavage site of proprotein convertases (PC). By analysis of microarray expression data, the mRNA level of furin was found to be up-regulated in RMS cell lines and biopsies compared to the other PC. The interaction between peptide and furin was validated using phage binding assays *in vivo* and *in vitro*, affinity chromatography and fluorescence microscopy of fluorescently labelled peptide. Moreover, a competition assay between RMS-P3 and a fluorogenic furin substrate showed that increasing concentrations of the peptide correlated with a decrease of substrate processing suggesting a role for RMS-P3 as a furin inhibitor (IC<sub>50</sub>: 50 μM). In order to further improve the peptide RMS-P3 binding and specificity for RMS, we addressed two important features: the peptide length and the sequence upstream of the furin binding site. Phage displayed peptides with increasing N-terminal amino acid deletions (from CGTINTRTKKC to CRTKKC) were produced and tested for binding on RMS cells. Interestingly, the furin recognition site alone, flanked by cysteines, was still able to bind RMS cells with high affinity, even if a decrease in the binding was observed after the deletion of two amino acids. This result not only confirmed furin as a peptide target in RMS, but also gave us the possibility to choose the length of the peptide for further studies involving the insertion of a new binding sequence upstream RXRR. This led us to create a shorter cyclic library (CX<sub>3</sub>RXRRC) randomizing three amino acids upstream the RXRR motif, to select possibly for a synergistic combination of sequences. Importantly, the screening identified two phages (named after the selected tri-amino acids as p-RGD and p-AGP) that show stronger binding to RMS cells *in vitro* and *in vivo* compared to RMS-P3.

The identification and validation of these targeting peptides for RMS and the confirmation of the importance of the furin recognition site for the binding highlighted the necessity to investigate the role of furin in RMS progression not only to improve the targeting of RMS but also to broaden the options for RMS treatment. Manipulation of furin activity in RMS cells by overexpression of furin or of its inhibitor PDX, or by specific genetic furin silencing, was used as a main approach to study the involvement of furin in RMS growth. The behavior of furin overexpressing RMS cells as well as furin inhibited/silenced cells was first studied in xenografted mice. Furin-overexpressing tumors showed a decreased latency time and an acceleration in the growth compared to wild type eRMS tumors. On the other hand, furin inhibited tumors exhibited a significant delay in growth. This last observation was true also for aRMS cells where inhibited/silenced tumors grew very slowly. The correlation between

inhibition of furin activity and delay in tumor growth revealed an interesting aspect of RMS tumor biology and confirmed a strong involvement of furin in the progression of the RMS tumors. This was further supported by the correlation between furin activity and microvessel density within tumors observed in both eRMS and aRMS. Moreover, *in vitro* studies performed with the same cells revealed a direct correlation between furin activity and the ability of these cells to migrate into an open wound or invade a gelatin membrane. Interestingly, no differences in *in vitro* proliferation were found among the cells, suggesting that furin enhances tumorigenic features other than simple proliferation. Additional studies of the maturation and activation by furin of several proteins known to be important in RMS, such as IGF1R, Notch, TGF $\beta$ , PDGFB, VEGFC or MT1-MMP, supported the correlation between furin and RMS tumorigenesis.

Taken together, we can assume that the processes of RMS progression are mediated by the ability of furin to increase the maturation of proteins involved in tumorigenesis. In conclusion, this research supports further investigation for the use of targeting peptides in RMS treatment and increases our knowledge about the mechanisms involved in RMS progression.

## SOMMARIO

Il rhabdomyosarcoma (RMS) rappresenta più della metà dei sarcomi delle parti molli in età pediatrica. Asportazione chirurgica, chemioterapia e radioterapia sono le terapie più comuni utilizzate ai giorni nostri contro i tumori pediatrici, anche se spesso si osservano resistenze alle convenzionali chemio e radioterapie che sono frequentemente la causa di effetti collaterali che possono presentarsi anche molti anni dopo il trattamento. Migliorare le terapie tumorali utilizzando un approccio più mirato è uno degli obiettivi principali della ricerca su tumori infantili.

Lo screening di una libreria fagica di peptidi circolari su linee cellulari e xenotrapianti di RMS ha portato all'identificazione di un peptide, nominato RMS-P3, con alta affinità per RMS sia *in vitro* che *in vivo*. La sequenza indispensabile per il legame è stata identificata come RX(R/K)(R/K), un sito di taglio riconosciuto dai membri della famiglia delle proproteine convertasi (PC). L'espressione endogena di tali proteine è stata analizzata in diverse linee cellulari e biopsie di RMS e la furina è risultata essere la PC più espressa in RMS. L'interazione tra il peptide e la furina è stata validata tramite "phage binding assays" *in vivo* e *in vitro*, cromatografia e immunofluorescenza. Inoltre un esperimento di competizione tra RMS-P3 e un substrato fluorogenico della furina ha dimostrato che, aumentando la concentrazione del peptide, la forma matura del substrato diminuisce, suggerendo un possibile ruolo del peptide RMS-P3 come inibitore della furina (IC<sub>50</sub>: 50 µM). Per migliorare la specificità di legame del peptide RMS-P3 per il RMS, due importanti caratteristiche sono state prese in considerazione: la lunghezza del peptide e la sequenza amminoacidica precedente il sito di riconoscimento della furina. A tale scopo, nuovi peptidi con delezioni nella parte N-terminale (da CGTINTRTKKC a CRTKKC) sono stati prodotti e testati su cellule di RMS. Il solo sito di riconoscimento della furina, fiancheggiato da cisteine, è stato capace di legarsi alle cellule di RMS con alta affinità, anche se una diminuzione di legame è stata osservata già dopo la delezione di due aminoacidi. Questo risultato non solo conferma la furina come target del peptide, ma ci ha permesso anche di poter decidere la lunghezza desiderata del peptide per successivi esperimenti sull'inserzione di una nuova sequenza di legame a monte di RXRR. Con l'intento di identificare motivi aggiuntivi, all'interno dello stesso peptide, che potrebbero aumentare l'efficienza di legame, è stata costruita una nuova libreria fagica più corta e con tre amminoacidi randomizzati nella parte precedente al motivo di riconoscimento della furina. Lo screening di tale libreria ha portato all'identificazione di due nuovi peptidi, p-AGP e p-RGD, con un'affinità maggiore per RMS rispetto al peptide originale sia *in vitro* che *in vivo*.

L'identificazione e validazione di questi peptidi e la conferma dell'importanza del sito di riconoscimento della furina per il legame con RMS, hanno evidenziato la necessità di investigare il ruolo della furina nella progressione del RMS, sia per aumentare il targeting sia per ampliare le opzioni per il trattamento di RMS. L'espressione della furina è stata modificata in linee cellulari di RMS tramite sovraespressione della furina stessa o di un inibitore delle PC ( $\alpha_1$ -PDX) e tramite silenziamento con shRNA. Tali cellule sono state utilizzate *in vitro* e *in vivo* per investigare l'importanza della furina nella crescita tumorale. Nello studio *in vivo* su topi xenotrapiantati, i tumori di eRMS sovraespressanti furina hanno mostrato una diminuzione del tempo di latenza e un aumento

della crescita dei tumori. Inoltre, l'inibizione della furina ha causato un ritardo significativo della crescita del tumore. Quest'ultimo effetto è stato riscontrato anche nei tumori di aRMS dove sia l'inibizione che il silenziamento della furina hanno causato ritardo nella crescita tumorale. Questa correlazione tra attività della furina e crescita tumorale rivela un aspetto interessante della biologia del RMS e conferma il coinvolgimento della furina nella progressione del RMS. Tale risultato è stato ulteriormente confermato dalla correlazione tra attività della furina e la formazione di nuovi vasi sanguinei all'interno dei tumori di eRMS e aRMS. Esperimenti *in vitro* effettuati utilizzando le stesse cellule modificate, hanno dimostrato una diretta correlazione tra l'attività della furina e la capacità delle cellule di migrare all'interno di uno spazio aperto e invadere una membrana anche se, curiosamente non sono state riscontrate *in vitro* differenze di proliferazione tra le cellule. Ciò suggerisce la capacità della furina di aumentare altre caratteristiche tumorali rispetto alla sola proliferazione. Inoltre, ulteriori studi sull'intervento della furina nella maturazione e attivazioni di proteine importanti nel RMS, come ad es. IGF1R, Notch, TGF $\beta$ , PDGFB, VEGFC or MT1-MMP, supportano l'ipotesi di una correlazione tra furina e tumorigenesi del RMS.

Alla luce dei risultati, possiamo assumere che i processi per la progressione del RMS sono mediati anche dall'abilità della furina di aumentare la maturazione delle proteine coinvolte nello sviluppo del tumore. In conclusione, questa ricerca promuove ulteriori studi sull'uso di peptidi per il trattamento del RMS e accresce le nostre conoscenze riguardanti i meccanismi coinvolti nella progressione del RMS.