

EPITHELIALE-MESENCHYMALE
TRANSITIE (EMT) BIJ
BORSTKANKER EN
METASTASERING

Mathieu Van Eetvelde

Stamnummer: 01206034

Promotor: Prof. Dr. G.Braems

Masterproef voorgelegd in het kader tot het behalen van de graad Master of Medicine in de Geneeskunde

Academiejaar: 2016 - 2018

Voorwoord:

Deze masterproef is het finaal werk na een intensieve en boeiende onderzoeksperiode. Het kadert in het behalen van mijn diploma tot Master of medicine in de Geneeskunde aan de UGent. Dit is het laatste schoolwerk vooraleer ik aan de stages kan beginnen. Voor mij is dit een soort afsluiter van het studentenleven waarvan ik veel mooie herinneringen heb.

Graag wil ik mijn promotor Prof. Dr. G. Braems bedanken voor de begeleiding die ik de voorbije twee jaar kreeg. Telkens gaf hij mij goede tips, interessante artikelen en opbouwende feedback die mij alleen maar vooruit bracht.

Daarnaast richt ik een woord van dank aan mijn ouders en zus voor de eindeloze steun die ik van hen kreeg. Ze hebben mijn werk meermaals gelezen en feedback gegeven over zaken waar ze over konden oordelen. Zonder hen zou ik nooit staan waar ik nu sta.

Inhoudstabel:

Voorwoord:	i
Inhoudstabel:	ii
Figurenlijst.....	iv
Tabbellenlijst	v
Afkortingen- / begrippenlijst	v
1. Abstract:	1
2. Inleiding:	3
2.1 EMT	3
2.1.1 Type 1 EMT	4
2.2 Type 2 EMT	9
2.2.1 Type 3 EMT	10
2.3 Borstkanker	11
2.3.1 Epidemiologie	12
2.3.2 Risicofactoren	13
2.4 EMT bij borstkanker	14
3. Methodologie.....	16
4. Resultaten	17
4.1 Moleculaire pathways bij de verschillende EMT klasse 's	17
4.1.1 Gen pathway bij EMT type 1 en type 2	17
4.1.2 Regulators die een rol spelen bij EMT type 3	17
4.1.2.1 PI3K-AKT-mTOR pathway (PAM pathway)	18
4.1.2.2 GSK-3 β /Wnt pathway	21
4.1.2.3 Regulators van de celpolariteit	24
4.1.2.4 MicroRNA familie	24
4.1.3 Bestaat EMT nu echt?	26
4.2 Metastase proces.....	29

4.2.1	Kankereigenschappen (Hallmarks of cancer)	29
4.2.1.1	Aanhoudende groei	30
4.2.1.2	Ontbreken van groei remmende signalen.....	30
4.2.1.3	Ontregelde celdood/apoptose mechanismen.....	31
4.2.1.4	Ongelimiteerde celdeling mechanismen.....	31
4.2.1.5	Inductie van angiogenese mechanismen	32
4.2.2	Activatie van invasie en metastase	32
4.2.2.1	Lokale invasie	34
4.2.2.2	Intravasatie	34
4.2.2.3	Circulatie.....	35
4.2.2.4	Extravasatie	35
4.2.2.5	Overleving.....	35
4.2.2.6	Uitgroei	35
4.3	Gen expressie profiel bij borstkanker	36
4.3.1	Verschillende klasse' s van borstkanker	36
4.3.1.1	Luminaal fenotype	37
4.3.1.2	HER2 gevoelige tumoren	37
4.3.1.3	Basaal-achtige fenotype	37
4.3.2	Verschil in expressie van EMT bij de verschillende borstkanker klasse' s.....	38
4.3.3	Algemene behandeling van borstkanker en geneesmiddelenresistentie op basis van EMT activatie.....	40
4.3.3.1	Taxol resistentie	41
4.3.3.2	Cisplatinum resistentie	41
4.3.4	Behandeling inwerkend op EMT pathways	43
5.	Discussie en besluit	44
6.	Referentielijst	48
7.	Bijlage	51
7.1	Plasticiteit bij EMT	51

7.2	TGF- β paradox	51
-----	----------------------------	----

Figurenlijst

Figuur 1: EMT proces.	3
Figuur 2: Klievingsedelingen van de bevruchte eicel met het vrijkomen van de blastocyst	5
Figuur 3: Implantatie met vorming van cytotrofoblast en syncytiotrofoblast.	6
Figuur 4: Gastrulatie	7
Figuur 5: Reversibiliteit gedurende de embryologische ontwikkeling	8
Figuur 6: Type 2 EMT	10
Figuur 7: Metastase proces door middel van EMT	11
Figuur 8: Het borstweefsel bij een volwassen vrouw bestaat uit klier- en vet-weefsel	12
Figuur 9: De 10 meest frequente tumoren per geslacht	13
Figuur 10: Verschillende regulatoren die een rol spelen in EMT type 3.	18
Figuur 11: Caveoline-1 zorgt voor stimulatie van de PI3K/AKT/mTOR pathway	19
Figuur 12: EMT geregeld via de PAM pathway.	20
Figuur 13: Wnt canonieke pathway.	22
Figuur 14: Samenvattende figuur van de extracellulaire en intracellulaire pathways betrokken bij EMT.	23
Figuur 15: De rol van miRNA bij de vorming van kanker.	25
Figuur 16: In vitro experiment van TNBC (triple negatieve basale cellen) behandeld met eribuline (microtubulus inhibitor).	27
Figuur 17: In vivo experiment van muizen met vergevorderde TNC (triple negatieve cellen) behandeld met eribuline (microtubulus inhibitor).	28
Figuur 18: Kankereigenschappen (The Hallmarks of Cancer).....	29
Figuur 19: Schematische weergave van de metastase cascade met de belangrijkste eiwitten die hierbij een rol spelen	34
Figuur 20: Expressie van E-cadherine en mTOR in drie verschillende subklasse 's van borstkanker	38

Figuur 21: Het verband tussen ER α , Bmi1 en E-cadherine.	39
Figuur 22: Cisplatinum resistentie mechanisme	42
Figuur 23: Werking van Denosumab.....	43
Figuur 24: EMT proces gebeurt in verschillende intermediaire toestanden	51
Figuur 25: TGF- β paradox bij kanker	52

Tabbellenlijst

Tabel 1: Borststadium en overlevingspercentage na 5 jaar	15
--	----

Afkortingen- / begrippenlijst

<i>Afkorting/begrip</i>	Uitleg
<i>Adenosis</i>	Is een goedaardige borstaandoening, waarbij de lobules verbreed zijn.
<i>Adherens junctions</i>	Is een eiwit complex dat instaat voor cel-cel conectie. Er bestaat ook tight junctions maar die liggen iets apicaler dan adherens junctions.
<i>AP-1</i>	Activation protein 1 is een transcriptie factor die de expressie van verschillende genen reguleert. Zoals cytokines, groeifactoren en stress.
<i>APC</i>	Adenomateuze polyposis coli gen is een tumorsupressor gen dat codeert voor APC proteïne. Het APC proteïne gaat het β -catenine eiwit afbreken (zie Wnt pathway).
<i>Apicaal</i>	Iets dat aan de bovenkant ligt
<i>aPKC</i>	Atypische proteïne kinase C voorbeelden zijn PKM ζ en PKC λ spelen een rol in de regeling van celpolariteit, cel motiliteit en vorming van filopodia. Deze zorgen ervoor dat kankercellen kunnen migreren.
<i>Axiaal</i>	Iets dat ter hoogte van de lichaamsas ligt.
<i>Axin</i>	Is een eiwit dat samen met APC, GSK3 β en CK1 het multi-subunit destructie complex vormt. Dit complex zorgt voor de afbraak van β -catenine bij geïnactiveerde Wnt pathway.

<i>Basaal</i>	lets dat aan de bodem ligt
<i>Basale membraan</i>	Is een laag van eiwitten zoals colageen en laminine die onder de epitheelcellen zitten. Het basale membraan zorgt voor steun en is een mechanische barrière voor infecties en metastase. Een tumor die nog niet doorbroken is door het basale membraan, noemt men een primaire tumor. Terwijl een tumor die wel doorbroken is door het basale membraan, is een secundaire tumor.
<i>β-catenine</i>	Beta-catenine is een eiwit met een duale functie. Enerzijds kan β -catenine binden met cadherine eiwit om de adherens juncties te vormen. En anderzijds is het een genregulator die een belangrijke rol heeft in de WNT pathway. De WNT pathway zal op zijn beurt EMT activeren.
<i>BCSC</i>	Breastcancer stem cells
<i>CK1</i>	Caseïne kinase 1 zie axin.
<i>CSC</i>	Cancer stem cells zijn kiemcellen die een oncogeen karakter hebben.
<i>Cyclin D</i>	Is een eiwit dat de celdeling positief doet stimuleren. Cycline-D is nodig voor de G1/S transitie toestand goed te doorlopen.
<i>Cytokeratine</i>	Is een keratine eiwit dat in de cel gelegen is. Deze eiwitten zijn een belangrijke component voor het vormen van een intermediaire filamenten. Intermediaire filamenten verhinderen mechanische stress.
<i>DSH</i>	Het Disheveled eiwit komt los bij binding van Wnt op het Frizzled receptor. Het discheveled zal dan binden met het GSK3- β waardoor β -catenine niet afgebroken kan worden.
<i>E-cadherine</i>	Cadherines zijn trans membraneuze eiwitten die een belangrijke rol hebben in de vorming van de “adherens junctions”. Deze adherens junctions zorgen ervoor dat cellen aan elkaar gebonden zijn. Het cadherine eiwit wordt geactiveerd door calcium, vandaar dat ze cadherine noemen. (Ca-dherine) E-cadherine slaat op epitheliale cadherine.
<i>Embryoblastcellen</i>	Zijn cellen die samen met de trofoblastcellen de blastocyst vormt. De embryoblastcellen vormt het embryo.
<i>EMT</i>	Epitheliale-Mesenchymale Transitie: het omvormingsproces van

	epitheelcel naar mesenchym cel
<i>EMT-transcriptiefactoren</i>	Epitheliale-Mesenchymale Transitie transcriptiefactoren zijn eiwitten die het overschrijven van een bepaald DNA-gen regelen. Deze factoren kunnen het overschrijvingsproces positief of negatief stimuleren. Deze transcriptiefactor wordt aangemaakt bij activatie van EMT. Vb.: SNAIL gaat de transcriptie van E-cadherine negatief doen beïnvloeden.
<i>Epiblast</i>	Vanaf dag 8 van de bevruchting gaan de embryoblastcellen opsplitsen in een externe laag van epiblast cellen en een interne laag van hypoblast cellen. Dit noemt men de bilaminaire embryogene schijf.
<i>Epitheelcellen</i>	Cellen die oppervlakkig en mooi naast elkaar gelegen zijn via cellulaire connecties.
<i>Epitheliale merkers</i>	Eiwitten die kenmerkend zijn voor epitheelcellen. Bij immunohistochemisch onderzoek kan men de expressiegraad van bepaalde eiwitten gaan opmeten. Wanneer bijvoorbeeld veel E-cadherine, cytokeratine (epitheliale merker) wordt gemeten dan wijst dit op de aanwezigheid van epitheel cellen.
<i>Epitheliale hyperplasie</i>	Is de toename van epitheelcellen door een verhoogde celdeling.
<i>Extracellulaire ruimte</i>	De ruimte die buiten de cel gelegen zijn
Extracellulaire matrix	Zijn de eiwitten die zich buiten de cel bevinden. Deze eiwitten voorzien stevigheid en structuur aan een weefsel. Voorbeelden van eiwitten zijn: collageen, elastine en glycosaminoglycanen (GAGs).
<i>Fzd</i>	Frizzled receptor is een receptor die het Wnt canonieke pathway doet activeren. Het ligand Wnt bindt op deze receptor en leidt tot activatie van de canonieke pathway.
<i>Gene expression profile</i>	Gen expressie profiel is een moleculair techniek die de activiteit/expressie van duizenden genen in een cel meet. Hierdoor kunnen cellen, hier tumorcellen een bepaald profiel krijgen en kan dat nuttig zijn voor de behandeling.

<i>GSK-3β/Wnt cascade</i>	Glycogeen synthase kinase 3 beta/ Wnt pathway is een pathway dat voornamelijk voorkomt bij embryogenese en kanker. Deze pathway staat in voor cel proliferatie en cel migratie.
<i>Gy</i>	Gray is de eenheid van een hoeveelheid absorberende ioniserende straling.
<i>HIF-1α</i>	Hypoxia-inducible factor 1-alpha is een transcriptionele regulator die de transcriptie van bepaalde genen zal regelen. HIF-1 α wordt vrijgesteld bij een toestand van hypoxie.
<i>hypoblast</i>	Zie epiblast
<i>Lateraal</i>	lets aan de zijkant gelegen.
<i>MAPK</i>	Zie RTK/RAS/MAPK pathway
<i>Menarche</i>	Is de leeftijd van het meisje waarbij ze voor het eerst haar regels krijgt.
<i>Mesenchymale cellen</i>	Cellen die het steunweefsel vormen. Deze cellen zijn langwerpig van vorm en zijn niet verbonden met andere cellen
<i>Mesenchymale merkers</i>	Zie epitheliale merkers. Voorbeelden van mesenchymale merkers zijn N-cadherine, vimentine en α smooth muscle actin (α -SMA).
<i>MET</i>	Mesenchymale-epitheliale transitie is het omgekeerde van epitheliale-mesenchymale transitie. Hier gaan de mesenchymcellen omgevormd worden tot epitheelcellen.
<i>miRNA</i>	Micro ribonucleïnezuur (RNA) is een niet coderende RNA dat de expressie van genen regelt. Deze RNA kan ook kankergenen regelen waardoor er kankervorming kan optreden.
<i>c-Myc</i>	Het cellulair myelocytomatosis oncogen eiwit (Myc) is een transcriptiefactor die een rol speelt in celgroei, celproliferatie en apoptose. Het Myc gen is een oncogen en zal bij kanker overmatig aangemaakt worden.
<i>N-cadherine</i>	Is een cadherine eiwit dat voornamelijk wordt aangemaakt tijdens de vorming van de neuronale plaat. Neuronale cellen zijn transiënte cellen die niet migreren. Toegenomen expressie van N-cadherine leidt tot een migratie van neuronale cellen en vorming van de neuronale plaat.

<i>NF-κB</i>	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells is een eiwitcomplex dat DNA transcriptie controleert en aanleiding heeft tot productie van cytokine en celoverleving.
<i>Papillomatosis/ juveniele papillomatosis</i>	Is een papillaire vervorming van het ductaal epitheel die een verhoogd risico geeft op borstkanker. Klinisch geven ze aanleiding tot bloederig tepelsecreet.
<i>Paraxiaal</i>	lets dat naast de lichaamsas ligt.
<i>PI3K-AKT-mTOR pathway of de PAM pathway</i>	Phosphoinositide 3-kinase(PI3K)/AKT/mamalian target of Refampicine (mTOR) pathway is een intracellulaire signalerende pathway die een belangrijke rol heeft in de celcyclus. Met celcyclus verstaat men celdeling en groei. In kanker is deze pathway verstoord.
<i>PKC</i>	Proteïne kinase C is een familie van proteïne kinase, dat anderen eiwitten fosforyleren of hydroxyleren. In heel veel cellen speelt PKC rol, zoals signaaltransductie die aanleiding heeft tot contractie of secretie. In kankercellen kan PKC aanleiding geven tot celgroei en EMT activatie. PKC kan in drie groepen onderverdeeld worden: 1) conventionele of klassieke PKC (vb.; PKC α , β 1, β 2 en PKC γ) 2) nieuwe PKC (vb. PKC δ , ϵ , η en PKC θ) en 3) atypische PKC (vb.: PKM ζ en PKC ι/λ)
<i>R-SMAD</i>	Receptor reguleerde SMAD bevat SMAD 1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 en SMAD8. Ze spelen een belangrijke rol in TGF β /SMAD pathway.
<i>RTK/Ras/MAPK pathway</i>	De receptor tyrosine kinase (RTK)/Ras/MAP kinase (MAPK) pathway activeert de PAM pathway wat leidt tot celgroei en cel overleving. Het Ras eiwit is een acroniem voor Rat sarcoom. Bij kanker is de RTK/Ras/MAPK in overmaat vrijgesteld.
<i>Snail</i>	Snail of SNAI1 is een zinkvinger proteïne dat de transcriptie van E-cadherine expressie onderdrukt. Een dergelijk eiwit wordt ook wel transcriptiefactor genoemd.
<i>SLUG</i>	SLUG of SNAI2 is een zinkvinger transcriptiefactor. Net zoals het Snail eiwit zal het de expressie van E-cadherine gaan onderdrukken.
<i>Src</i>	De naam Src eiwit is afkomstig van sarcoom. Het Src eiwit is een non-receptor tyrosine kinase proteïne. Dit eiwit fosfolyseert specifieke tyrosine residuen. Wanneer Src tyrosine kinase in overmaat

	vrijgesteld is wordt deze gelinkt aan kanker.
<i>Tcis</i>	Tumor carcinoma in situ. De tumor is het basale membraan nog niet doorgebroken en bevindt zich nog in het huidig weefsel.
<i>TCF/LEF familie</i>	TCF/LEF familie zijn transcriptiefactoren die binden op een specifiek DNA domein (high mobility group domein).
<i>TGFβ/SMAD pathway</i>	De transforming growth factor beta (TGFβ)/ SMAD pathway is betrokken in verschillende cellulaire processen zoals cel groei, cel differentiatie en apoptose. SMAD is een acroniem van een drosophila proteïne, mothers against decapentaplegic (MAD) en een Caenorhabditis elegans eiwit, SMA.
<i>TNM</i>	Tumor, Nodes en Metastasis. Is een classificatie die tumoren onderverdeeld op basis van de tumorgrootte, de aanwezigheid tumoren in aanliggende klieren en het voorkomen van metastase.
<i>Transcriptie</i>	Is het proces waarbij een DNA streng die een gen bevat wordt overgeschreven tot een enkelstrengig mRNA. Dit is de eerste stap voor het vormen van een eiwit. Vervolgens gebeurt translatie waarbij de enkelstrengig mRNA wordt vertaald tot een eiwitstructuur.
<i>Trofoblastcellen</i>	Een bevruchte eikel zal vanaf dag 5 in een blastocyst omgevormd worden. Een blastocyst bestaat uit trofoblastcellen en embryoblastcellen. De trofoblastcellen vormen de latere placenta en de dooierzak.
<i>Twist</i>	Is een Basic helix-loop-helix transcriptiefactor. Net zoals het Snail eiwit zal het de expressie van E-cadherine gaan onderdrukken.
<i>ZEB1/ZEB2</i>	Zinkvinger E-box bindend homebox 1 is een transcriptiefactor. ZEB gaat de expressie van T-lymfocyt specifieke IL2 gen gaan onderdrukken. Net zoals het Snail eiwit zal het de expressie van E-cadherine gaan onderdrukken.
<i>ZO-1</i>	Zonula occludens-1 ook gekend als Tight junctions proteïne-1 is een perifere membraan proteïne die een rol heeft in bepaalde pathways.
<i>Zona pellucida</i>	Is een beschermende laag rond de eikel die er voor zorgt dat de eikel bij transport niet gaat blijven vastkleven (vb. de wand van de eileider). Deze laag wordt pas afgebroken op dag 5 van de bevruchting.

1. Abstract:

Inleiding: Epitheliale-Mesenchymale Transitie (EMT) is een biologisch proces dat een rol heeft in verschillende processen in het lichaam. Zo kan men drie verschillende EMT klasse 's opmaken: EMT type 1, EMT type 2 en EMT type 3. EMT type 1 speelt een rol tijdens de embryologie, EMT type 2 bij wondheling. Ten slotte staat het EMT type 3 in voor het proces van metastase bij kankercellen, afkomstig uit epitheelcellen ook wel carcinomen genoemd. De ziekte borstkanker ontstaat door een omvormingsproces, waarbij de epitheelcellen uit de borst omgevormd worden tot cellen die continu delen en groeien. In deze masterproef wordt onderzocht welke signaalcascade-eiwitten een rol spelen in het ontstaan van EMT bij borstkanker. Vervolgens wordt het metastase proces bij borstkanker besproken. En finaal worden de verschillende subtypes van borstkanker, de graad van EMT bij de verschillende subklasse 's van borstkanker en de behandeling van borstkanker met de daarbij horende geneesmiddelresistentie onderzocht.

Methodologie: Het onderzoekswerk van artikelen gebeurde in de database PubMed. Er werd gezocht naar artikelen, met de zoekterm: "molecular and pathological signatures of EMT", "EMT transcriptor factors", "EMT micro RNA's", "Targets of breast cancer metastasis", "local invasion of breast metastasis", "gene expression profile breast cancer", "EMT breast cancer therapie".

Resultaten: Verschillende signaalcascade of pathway's spelen een rol in de vorming van EMT bij borstkanker. Zo spelen volgende pathways een rol: PAM pathway, de GSK-3 β /Wnt cascade, Cel polariteit regulatoren en de microRNA's. De pathways worden geactiveerd na een mutatie van een bepaald gen die dan verder leiden tot EMT. Dit gebeurt via activatie van transcriptiefactoren zoals snail, twist en Zeb 1. Deze transcriptiefactoren gaan zorgen voor een daling van E-cadherine wat leidt tot verminderde cel-cel communicatie.

Het metastase proces bij borstkanker gebeurt in verschillende stappen intravasatie, circulatie, extravasatie en uitgroei van de tumor. Alle verschillende stappen hebben bepaalde eiwitten nodig om de tumor tot de volgende stap te brengen. Afhankelijk van de subklasse van borstkanker kan de tumor metastaseren naar bot, longen of hersenen.

De verschillende subklasse 's opgedeeld op basis van hun eiwitexpressie zijn: de lumbale, HER2+ en de triple negatieve tumorcellen. Uit studie's is gebleken dat de drie subklasse 's een significant verschil in EMT expressie vertonen. Echter is het nog niet duidelijk welke subklasse nu meer of minder EMT expressie vertoont. Borstkanker wordt op drie niveaus behandeld, namelijk: eerst lokaal, vervolgens locoregionaal en finaal systemisch. Dit vertaalt zich in de praktijk als volgt: Een tumor in de borst wordt eerst weggenomen, vervolgens geeft

men radiotherapie en als laatste geeft men hormonale en chemotherapie. Radiotherapie, hormonale en chemotherapie worden gebruikt bij preventie om te voorkomen dat metastase zou ontstaan. Sommige geneesmiddelen, zoals Taxol en cisplatinum vertonen resistentie gebaseerd op EMT activatie. Taxol wordt resistent aan kanker door activatie van de PAM pathway. En cisplatinum bouwt zijn resistentie op door de EGFR pathway te activeren. Beide pathways zorgen voor activatie van EMT.

Discussie: De informatie gehaald over EMT bij borstkanker werd voornamelijk genomen uit in vitro-experimenten. Dit zorgt ervoor dat men niet kan aannemen dat het EMT model werkelijk gebeurd omdat er nog niet genoeg in vivo studies zijn die EMT met kanker doen linken. Daarom is er een hoge nood aan in vivo experimenten betreffende EMT en kanker om deze theorie te bevestigen. In vivo experimenten hebben strenge voorwaarden vooraleer proeven gedaan mogen worden. Hierdoor kan men niet alles onderzoeken wat men wenst te onderzoeken.

Het beter begrijpen van de verschillende pathway's van EMT en metastase proces kan ons leiden tot therapeutisch doeleinde. Met andere woorden kan men met deze kennis een blokker ontwikkelen die inwerkt op een pathway en gebruiken voor de behandeling van metastase bij borstkanker.

Iedere subklasse van borstkanker heeft een verschillende graad van EMT expressie. Maar de resultaten over EMT expressie zijn niet in iedere studie dezelfde. Dit komt doordat men borstkanker in drie subklasse 's (luminaal, tripple negatief en HER2+) indeelt. Deze indeling heeft vaak overlap en zijn weinig specifiek. Er is dus nood aan specifiekere merkers die een eenduidig resultaat geven over EMT expressie.

Conclusie: Epitheliale-mesenchymale transitie heeft waarschijnlijk een belangrijke rol bij borstkanker. Ze staat immers in voor het metastase proces bij borstkanker. Verder in vivo onderzoek moet deze theorie bevestigen en kan leiden tot nieuwe inzichten en behandelingsvormen bij borstkanker.

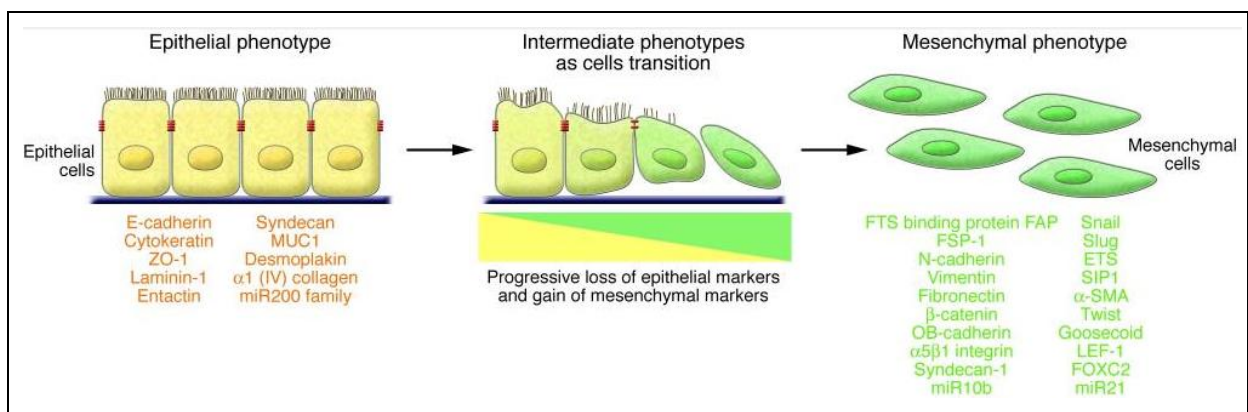
2. Inleiding:

2.1 EMT

Epitheliale-mesenchymale transitie (EMT) is een biologisch proces waarbij gepolariseerde epitheelcellen, die normaal gezien vastzitten aan het basale membraan, verschillende biochemische veranderingen ondergaan om een mesenchymaal fenotype/vorm te krijgen.

Epitheelcellen hebben een duidelijke bovenkant en onderkant, ook wel apicaal en basaal genoemd. Ze hebben de eigenschap om zich aan elkaar vast te klampen door middel van cel-to-cel juncties. Mesenchymale cellen echter zijn meer langwerpige cellen die vrij kunnen bewegen in de extracellulaire ruimte (1). De omzetting van epitheelcellen tot mesenchymcellen zorgt ervoor dat cellen beter migreren doorheen de bloedbaan (nuttig tijdens de embryogenese en metastasering), meer weerstand opbouwen tegenover apoptose (nuttig bij kankercellen) en meer extracellulaire matrix (ECM) componenten produceren dan epitheelcellen (nuttig bij wondheling).

EMT gebeurt onder invloed van allerlei moleculaire veranderingen. Deze omvat onder andere activatie van EMT-transcriptie factoren (EMT-TFs), expressie van specifieke celmembraaneiwiitten, herschikkingen van cytoskeletale proteïnen, productie van ECM-afbrekende enzymen en verandering in de expressie van microRNAs (2).



Figuur 1: EMT proces. Het EMT proces is een omzetting van gepolariseerde epitheelcellen in mobiele mesenchymcellen. Hierbij ontstaat er een verlies van epitheliale merkers (eiwiitten die kenmerkend zijn voor epitheel cellen) zoals E-cadherin, cytokeratine en een winst aan mesenchymale merkers zoals N-cadherine en β -catenine (2).

Via een immunohistochemisch onderzoek kan men het EMT proces opmeten. Epitheelcellen en mesenchymcellen maken specifieke eiwiitten aan die kenmerkend zijn voor deze cellen.

Deze eiwitten worden ook merkers genoemd. Op basis van die eiwitten kan men meten of epitheelcellen omgevormd zijn naar mesenchymcellen. Voorbeelden van epitheliale merkers (zie figuur 1) zijn E-cadherine en cytokeratine. Deze eiwitten hebben twee verschillende functies. E-Cadherine is een eiwit dat een belangrijke functie heeft in de vorming van adherens junctions (een eiwitcomplex die instaat voor cel-cel connectie) (3). Cytokeratine is een eiwit dat de vorming van intermediaire filamenten (zijn ewn die instaan voor stabiliteit van de cel) bevordert (4). Na EMT zullen kankercellen een verhoogde expressie hebben van mesenchymale merkers. Voorbeelden van mesenchymale merkers zijn N-cadherine en β -catenine. Het N-cadherine eiwit is zoals E-cadherine een eiwit dat adherens junctions vormt. Dit eiwit wordt voornamelijk vrijgesteld tijdens het vormen van de neurale buis, een onderdeel van de embryologie. Hierbij zal N-cadherine aanleiding geven tot neuronale celmigratie (5). Het β -catenine eiwit heeft twee functies. Enerzijds kan het β -catenine met cadherine eiwitten binden om het adherens junctions te vormen. En anderzijds is β -catenine een genregulator die de WNT pathway doet activeren waardoor EMT in actie treedt (6). Een epitheelcel die omgevormd is tot mesenchymcel vertoont een overexpressie van β -catenine. β -Catenine is dus alleen bij overexpressie een goede merker voor mesenchym cellen.

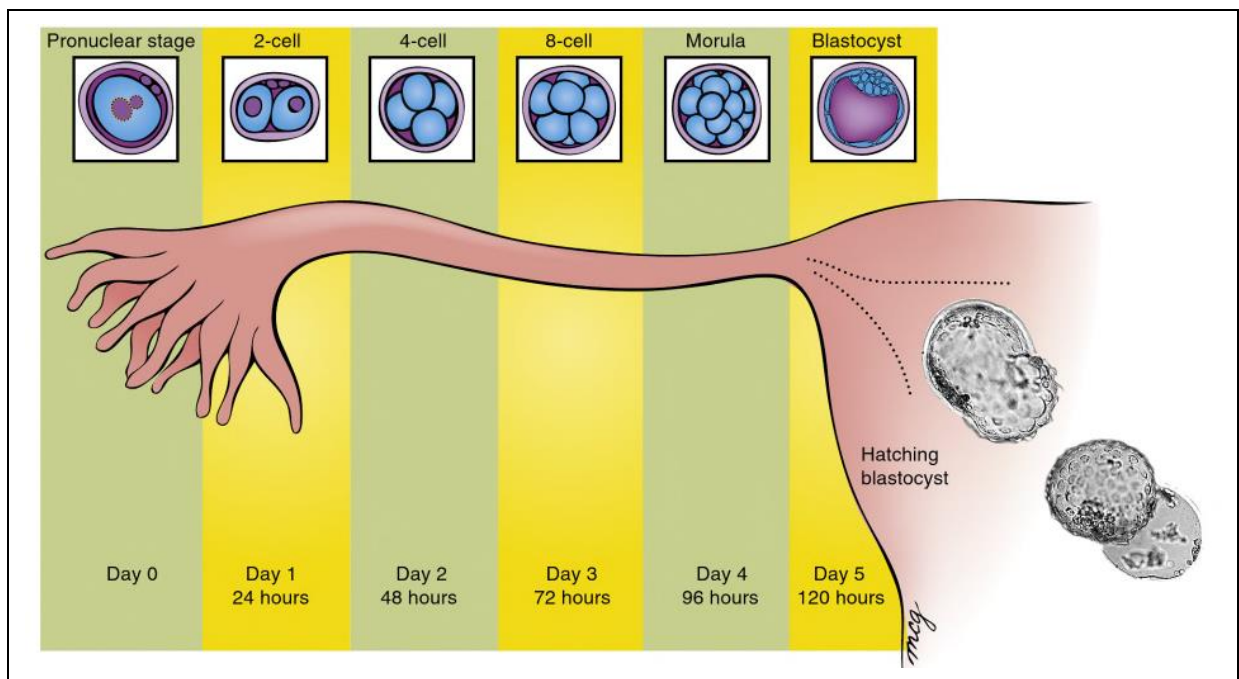
Een specifieke eigenschap van het EMT proces, is dat gevormde mesenchymcellen weer omgevormd kunnen worden tot epitheelcellen. Het omkeringsproces noemt men de mesenchymale-epitheliale transitie (MET). In bijlage 1 wordt dit fenomeen gedetailleerder uitgelegd. Cellen die deze reversibele eigenschap hebben om van fenotype te veranderen, zijn cellen met een grote graad aan plasticiteit. Deze eigenschap ziet men niet alleen bij kankercellen maar ziet men ook bij embryologische cellen, wat later nog besproken wordt (7).

Er bestaan drie types epitheliale-mesenchymale transities. Type 1 EMT is de epitheliale-mesenchymale transitie die plaatsvindt tijdens de implantatie van het embryo, de embryogenese en orgaan ontwikkeling. Type 2 EMT is de epitheliale-mesenchymale transitie nodig bij wondheling, weefselherstel en fibrose vorming. Ten slotte, de type 3 EMT is de epitheliale-mesenchymale transitie bij kanker en metastase. Merk op dat Type 2 en 3 plaatsvinden in de volwassen stadia terwijl type 1 uitsluitend voorkomt tijdens de embryogenese.

2.1.1 Type 1 EMT

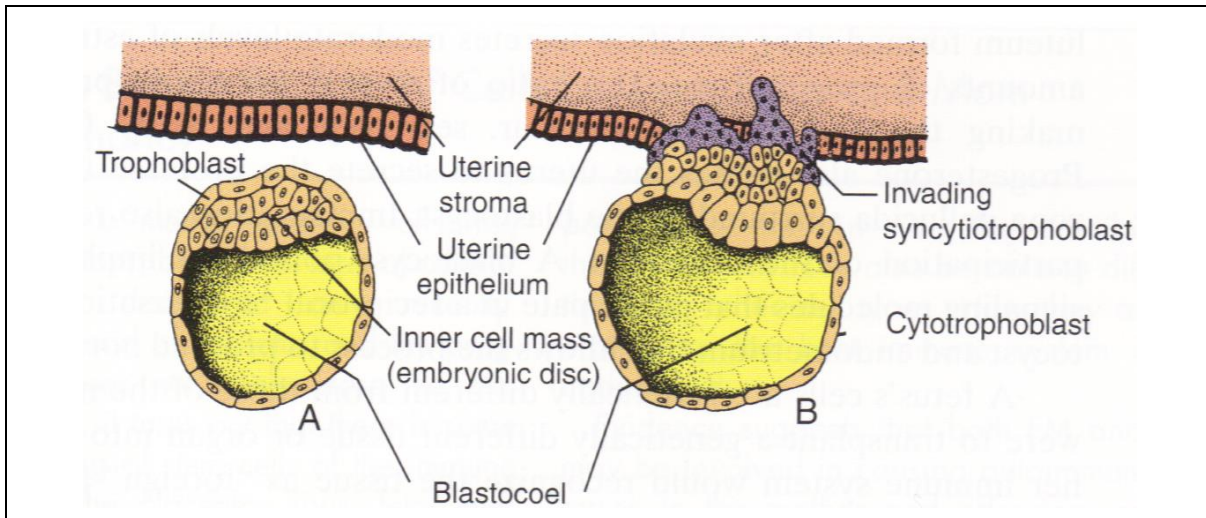
Type 1 EMT is de epitheliale-mesenchymale transitie die plaatsvindt tijdens de implantatie van het embryo, embryogenese en orgaan ontwikkeling.

Een bevruchte eikel zal in de eileider verschillende delingen ondergaan. Zo gaat de bevruchte eikel omvormen in een 2-cellig stadium, vervolgens in een 4 en 8-cellig stadium. Nadien bevindt het zich in een morula stadium, dat uiteindelijk overgaat in het blastocysten stadium. Blastocysten bestaan uit embryoblastcellen en trofoblastcellen. De embryoblastcellen gaan later de epiblast en hypoblastlaag vormen. Op dag 5 van de embryogenese komt de blastocyst uit de zona pellucida vrij, wat een beschermlaag is rond de blastocyst. Hierdoor kan de blastocyst zich vasthechten met de baarmoeder ook wel endometrium genoemd.



Figuur 2: Klievingsedelingen van de bevruchte eikel met het vrijkomen van de blastocyst (8)

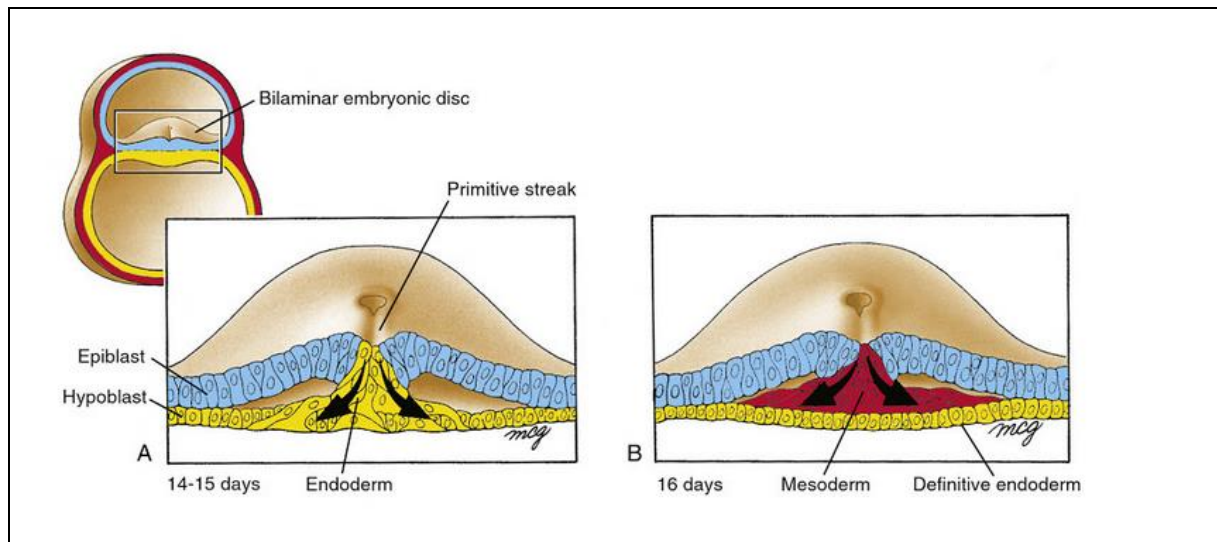
Bij deze implantatie ontstaat er een Epitheliale-mesenchymale transitie van trofoblastcellen (zie figuur 3). Trofoblastcellen worden omgevormd tot cytotrofoblast en syncytiotrofoblast, deze kunnen beter door het endometrium indringen dan trofoblastcellen. Dit is de eerste vorm van EMT tijdens de embryogenese (8).



Figuur 3: Implantatie met vorming van cytotrofoblast en syncytiotrofoblast. De trophoblastcellen van de blastocyst gaan in interactie met het epitheel van de baarmoeder (uterus). Na binding van deze cellen ontstaat er een EMT, waarbij trophoblastcellen worden omgezet in syncytiotrofoblast en cytotrofoblast (9).

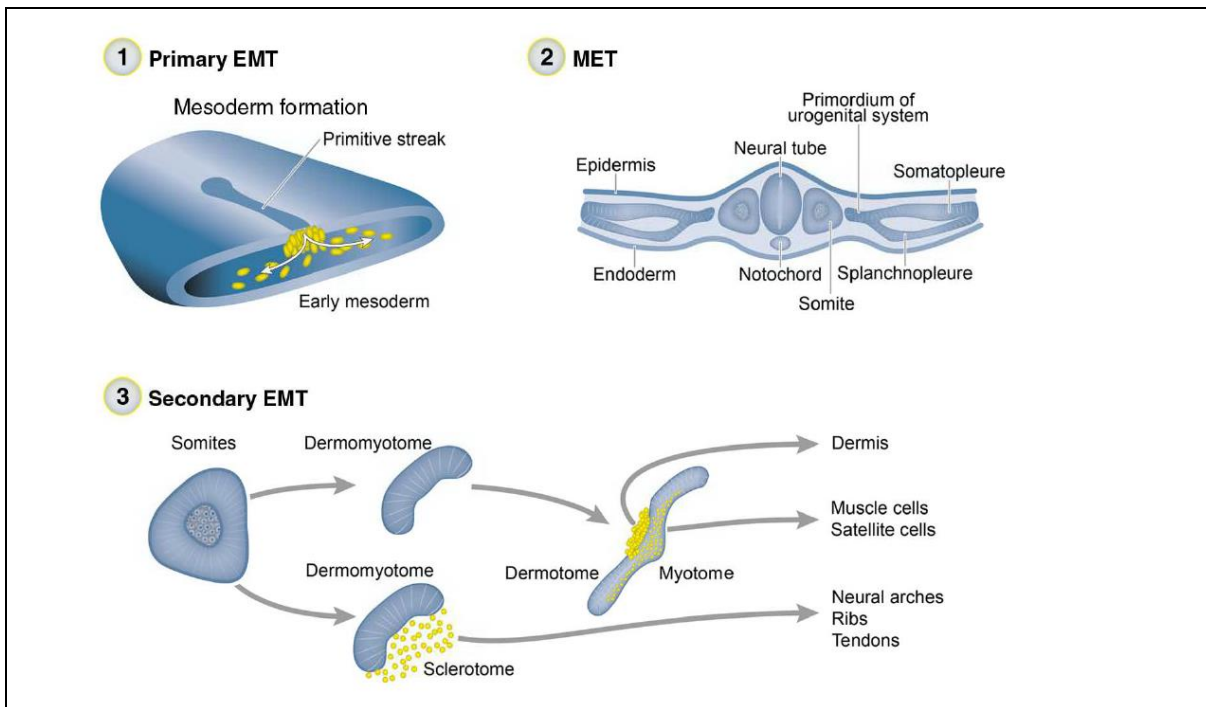
Vanaf de derde week van de embryogenese vindt de gastrulatie plaats (zie figuur 4). Dit proces begint met het vormen van de primitieve strook ("primitive streak") op de bilaminaire embryonale schijf, bestaande uit epiblast en hypoblast cellen. Tijdens de gastrulatie gaan epiblastcellen migreren doorheen de primitieve strook naar bepaalde plaatsen in het embryo. Gastrulatie kan alleen gebeuren wanneer er bij epiblastcellen een Epitheliale-mesenchymale transitie (EMT) is voorafgegaan. Epitheliale-mesenchymale transitie van epiblastcellen is nodig om door het embryo te kunnen migreren (8). De EMT bij gastrulatie wordt ook wel primaire EMT genoemd.

De epiblast cellen die als eerste door de primitieve groeve migreren zullen in de hypoblast-laag terechtkomen. Deze cellen gaan samen met de hypoblastcellen de definitieve endoderm laag vormen. Nadien gaan de epiblastcellen migreren naar de ruimte tussen de epiblast en endoderm, om het mesoderm te vormen. Dit mesoderm bestaat uit zowel intra-embryonale als extra-embryonale mesoderm. Eenmaal het mesoderm en het endoderm gevormd zijn zullen de epiblast cellen niet meer door de primitieve groeve migreren en vormen de resterende epiblastcellen het ectoderm. Deze drie kiemlagen (endoderm, mesoderm en ectoderm) hebben alle drie specifieke eigenschappen die later aanleiding geven tot het aanmaken van verschillende weefsels (8).



Figuur 4: Gastrulatie (8)

Na de gastrulatie zullen het intra-embryonale mesoderm cellen migreren naar verschillende plaatsen in het embryo (axiaal, paraxiaal en lateraal). Deze intra-embryonale cellen die nog altijd mesenchymale cellen zijn, zullen bij het bereiken van hun doel-locatie een mesenchymale-epitheliale transitie proces (MET-proces) ondergaan. Het MET-proces geeft aanleiding tot vorming van de notochord, somieten, voorlopers van het urogenitaal stelsel, splanchnopleura en somatopleura (figuur 5). Nadien vindt er een tweede ronde van EMT plaats, ook wel secundaire EMT genoemd. Het dorsale gedeelte van de somieten wordt omgezet tot dermale en myotomale mesenchymen. Deze worden spiercellen, satelietcellen en cellen van de dermis. Het ventrale gedeelte van de somieten differentiëren tot het sclerotomale mesenchym, die daarna ruggenwervels, ribben en pezen worden (7). Wat men echter niet mag verwarren is dat de dorsale somieten aanleiding geeft tot de cellen van de dorsale dermislaag en niet de volledige huid. De ventrale dermislaag is afkomstig van de somatische laag, van de lateraal plaat mesoderm. De huid is opgebouwd uit de epidermis, dermis en hypodermis. De epidermis wordt al gevormd na de primaire EMT en MET. Epidermis zal geen tweede ronde van EMT nodig hebben. Hypodermis bestaat uit vetcellen en wordt niet gevormd uit dorsale somieten (8).



Figuur 5: Reversibiliteit gedurende de embryologische ontwikkeling (7).

Tijdens de embryogenese worden kiemcellen gebruikt voor de aanmaak van diverse weefsels. Kiemcellen kunnen ook voorkomen bij kankercellen. Deze kiemcellen worden ook “cancer stem cells” (CSC) genoemd. CSC ontstaan uit tumorcellen of uit lichaamseigen stamcellen, die een oncogene transformatie hebben ondergaan (10). Deze stamcellen hebben een hogere graad aan plasticiteit dan gewone kankercellen. Ze switchen veel sneller van een epitheliale toestand naar een mesenchymale toestand op basis van EMT (11). Hierdoor kunnen ze sneller uitzaaien naar andere locaties dan gewone kankercellen om daar nieuwe haarden te vormen. Met andere woorden CSC gaan omgevormd worden tot een mesenchymale vorm. Daardoor kan de stamcel vanuit de bloedbaan uitzaaien naar een nieuwe locatie waarbij CSC kunnen differentiëren tot een andere soort van kankers (10). Bijvoorbeeld het EMT-proces kan ervoor zorgen dat “breast cancer stem cells” (BCSC) worden omgevormd tot een mesenchymale vorm. Deze mesenchymale vormen van kanker belanden op de doellocatie en differentiëren vervolgens verder tot lumenale, basale of ductale vormen van borstkanker (11). Met andere woorden, kankercellen zullen door het vormen van CSC en EMT niet alleen de eigenschap hebben om uit te zaaien naar ander organen maar ook de eigenschap hebben om zelfvernieuwendheid en resistentie van antitumorale middelen op te bouwen (12). Dit toont aan dat er een grote gelijkenis is tussen de embryologie en kankervorming.

2.2 Type 2 EMT

Type 2 EMT is de epitheliale-mesenchymale transitie nodig bij wondheling, weefselherstel en fibrose vorming.

Fibrose is een ziekte waarbij er ongecontroleerd bindweefsel wordt opgestapeld in weefsels van organen. Dit zorgt ervoor dat het orgaan minder goed zal functioneren. Men klasseert fibrose in systemische fibrose en anderzijds orgaan specifieke fibrose. Systemische fibrose komt het meest voor. Een bekend voorbeeld is de Systemische Sclerose (SSc). Systemische Sclerose is een auto-immuun aandoening waarbij sclerodermie, verharding van de huid als belangrijkste kenmerk van de ziekte wordt gezien. De ziekte begint meestal met huidsymptomen zoals: sclerodermie, fenomeen van Raynaud, non-pitting oedeem en digitale ulcera maar zal geleidelijk meer systemische symptomen vertonen zoals: longfibrose en nierfibrose (13). Voorbeelden van orgaanspecifieke fibrose zijn hart-, long- en nierfibrose.

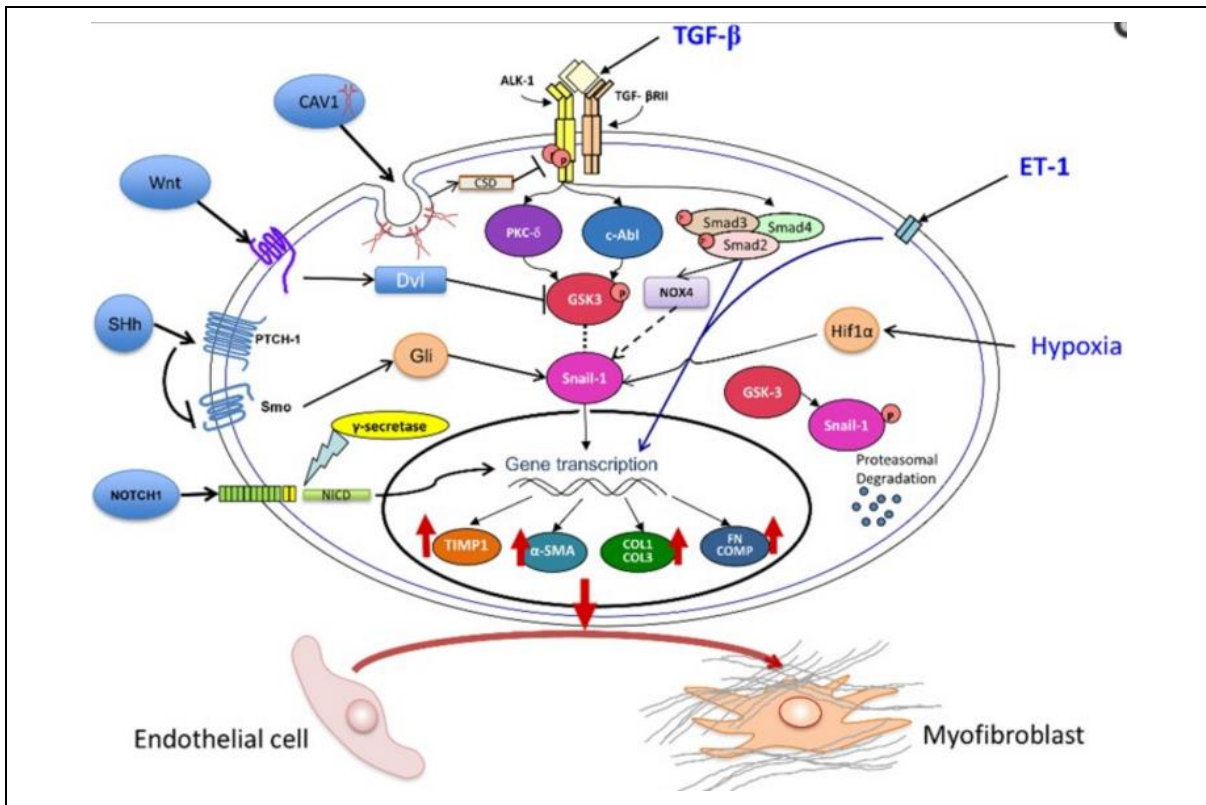
Fibrose wordt op twee manieren aangedreven. Enerzijds is er een verhoogde expressie van extracellulaire proteïnen zoals collageen enzymen (type I, III, V en VI), fibronectine en cartilago oligomerische matrix proteïnen (COMP) ("cartilage oligomeric matrix protein"). Anderzijds worden er minder ECM degraderende enzymen geproduceerd. Dit wordt veroorzaakt door de productie van Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) (14).

De cellen die verantwoordelijk zijn voor fibrose zijn myofibroblast cellen. Myofibroblast cellen gaan α -smooth muscle actin (α -SMA), fibrillaire collageen (type I, III) en TIMPs afscheiden, wat aanleiding heeft tot opstapeling van extracellulair weefsel. Actine is een eiwitpolymeer dat instaat voor spiercontractie. Myofibroblast cellen kunnen uit verschillende voorlopercellen ontstaan. Zo kunnen myofibroblasten afkomstig zijn van weefselfibroblasten, beenmerg-gedevieerde fibrocyten, epitheel- en endotheelcellen, adipocyten en macrofagen.

Bij fibrose worden de epitheel-en endotheelcellen omgevormd tot myofibroblast cellen. Dit gebeurt door een EMT/ endothelial mesenchymale transitie (EndoMT). EndoMT kan zowel gedeeltelijk als volledig gebeuren. Beide vormen geven aanleiding tot pathologische fibrose. Eenmaal de myofibroblasten zijn omgevormd worden bindweefselenzymen gesecreteerd (14).

De endoMT gebeurt d.m.v. activatie van Tumor growth factor- β (TGF- β), ET-1, NOTCH, CAV-1, Wnt, NOX4, en HIF-1 α pathways. De belangrijkste pathway is de TGF- β pathway. TGF- β bindt op Smad eiwitten die op hun beurt NOX 4 stimuleren, wat leidt tot expressie van SNAIL-1. SNAIL-1 is een transcriptiefactor die instaat voor de activatie van EndoMT eiwitten. Een andere belangrijke pathway in het fibroseproces is de hypoxia inducible factor- α (HIF- α)

pathway. Hypoxie stimuleert het transcriptiefactor HIF- α die op zijn beurt het SNAIL eiwit doet activeren.



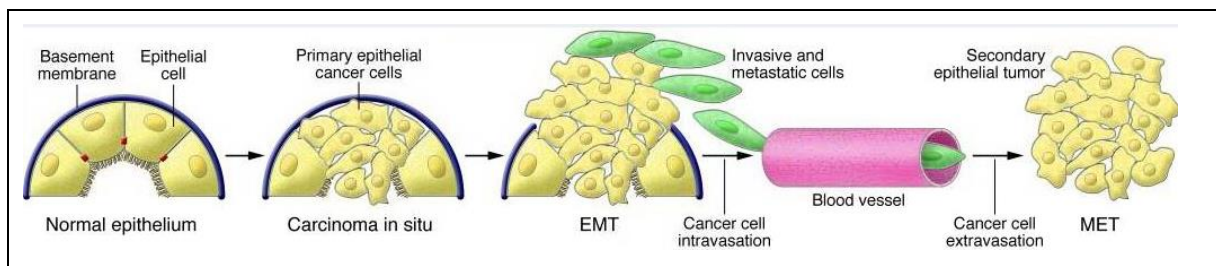
Figuur 6: Type 2 EMT (14)

HIF-1 α heeft ook een belangrijke rol bij kanker. Kankercellen die toenemen in aantal en in volume zullen met de normale bloedtoevoer in zuurstofnood geraken. Deze toestand noemt men ook hypoxie. Kankercellen krijgen minder zuurstof doordat de vascularisatie of bloedtoevoer niet meer voldoet aan de noden van de tumorcellen. Eenmaal de kankercel hypoxisch is wordt HIF-1 α gesecreteerd en wordt hierdoor angiogenese, glucose metabolisme, cel proliferatie, invasie en metastase bevorderd (15).

2.2.1 Type 3 EMT

Type 3 EMT is de EMT die voorkomt bij kanker en metastaseprocessen. Kankercellen ontstaan door genetische en epi-genetische mutaties. Genen die verantwoordelijk zijn voor groei en differentiatie zijn oncogenen, echter genen die instaan voor geprogrammeerde celdood of apoptose zijn tumorsupressorgenen. Het vormen van een kankercel gebeurt door activatie van oncogenen of het uitschakelen van tumorsupressorgenen, en gebeurt onder invloed van genetische wijzigingen. Een specifieke vorm van oncogen stimulatie zijn genen die EMT activeren.

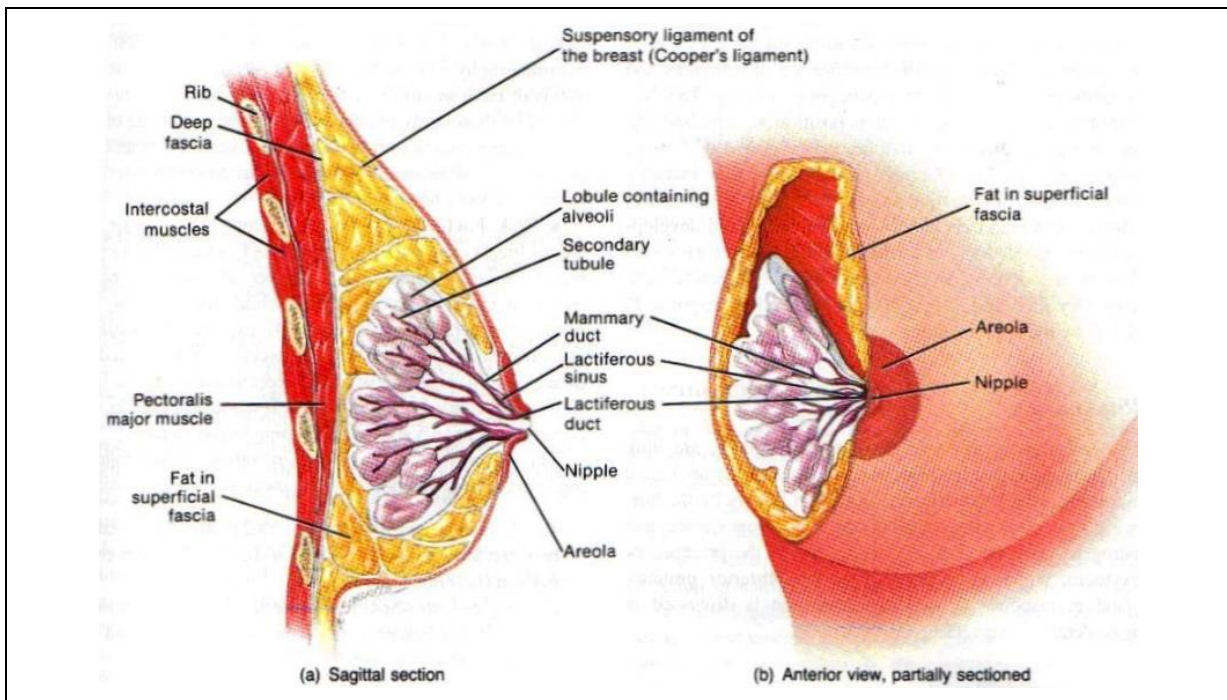
Carcinomacellen zijn primaire epitheliale kankercellen die een EMT proces kunnen ondergaan. Eenmaal een kankercel van een epitheliale naar een mesenchymale vorm veranderd is, kan de kankercel door het basale membraan gaan en in de bloedbaan terechtkomen. Dit proces van metastase leidt ertoe dat primaire haarden verspreid kunnen worden naar nieuwe locaties. Wanneer de mesenchymcellen hun doellocatie bereikt hebben, gebeurt er een omkeringsproces waarbij de mesenchymale kankercellen omgevormd worden tot de epitheliale vorm. Deze nieuw gevormde epitheliale kankers worden de secundaire haard genoemd (2).



Figuur 7: Metastase proces door middel van EMT (2)

2.3 Borstkanker

Borstkanker is een afwijking in de borst met een maligne karakter. Een borst is samengesteld uit borstklierweefsel en vet (zie figuur 8). Borstklierweefsel bestaat uit gewone klierbuizen, of ducti en secretoire eindknopjes of lobuli genoemd. Als men een verticale/sagittale doorsnede maakt van de borst, zal men volgende structuren tegenkomen, in volgorde van oppervlakkig naar diep: ducti lactiferi, sini lactiferi, mammaire ducti, secundaire tubuli en lobules bij volwassen vrouwen.



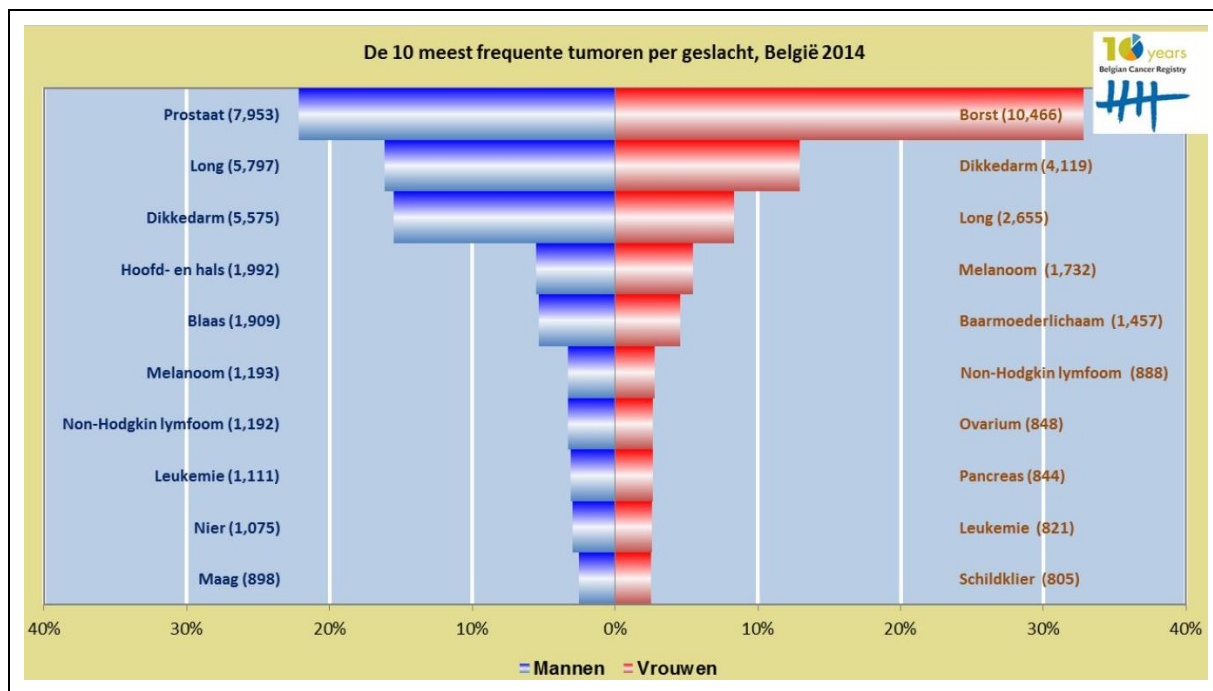
Figuur 8: Het borstweefsel bij een volwassen vrouw bestaat uit klier- en vet-weefsel (16).

Borstkankers kunnen op basis van hun anatomie onderverdeeld worden in verschillende types. Het frequentste type is het ductaal carcinoom (80%), gevolgd door het lobulair carcinoom (10%). Het ductaal carcinoom ontstaat uit de ductus lactiferus of de mammaire ductus. Dit in tegenstelling tot het lobulaire carcinoom, afkomstig uit de lobuli. Zeldzamere borsttumoren zijn het tubulair carcinoom, het medullair carcinoom en het mucoïd carcinoom (17). Merk op dat deze macroscopische onderverdeling een andere verdeling is dan de microscopische onderverdeling op basis van eiwitexpressie die besproken wordt in het laatste deel van de thesis.

Lobulaire carcinomata ondervinden een verlies aan E-cadherine waardoor ze gemakkelijker door de basale membraan kunnen infiltreren. Dit wijst erop dat het lobulaire carcinoom onderhevig is aan EMT.

2.3.1 Epidemiologie

Jaarlijks worden in België ongeveer 10.500 nieuwe gevallen van borstkanker vastgesteld, daarmee is het de meest voorkomende tumor bij vrouwen (18) (zie figuur 9). Het risico voor een vrouw om in de loop van haar leven borstkanker te ontwikkelen bedraagt 11,1%. De 5 jaar overleving van borstkanker bedraagt gemiddeld 80% (19).



Figuur 9: De 10 meest frequente tumoren per geslacht (18)

2.3.2 Risicofactoren

De meeste borstkankers zijn hormoonafhankelijk. Vrouwen worden vanaf de leeftijd dat ze hun eerste menstruele cyclus krijgen (menarche) tot aan de menopauze, blootgesteld aan seksuele hormonen. Deze langdurige blootstelling aan hormonen zorgt ervoor dat vrouwen gevoeliger zijn aan borstkanker dan mannen. De meeste van de hieronder vernoemde risicofactoren zijn gelinkt met de hoeveelheid geslachtshormonen in het bloed (17).

De risicofactoren worden onderverdeeld in niet-beïnvloedbare en beïnvloedbare factoren. Tot de niet-beïnvloedbare factoren behoren: leeftijd waarop borstkanker ontwikkelt, leeftijd van de menarche en menopauze, geografische factoren, voorgeschiedenis van goedaardige borstaandoeningen en genetische predispositie (17).

- *Leeftijd*: Borstkanker is zeer zeldzaam voor de leeftijd van 30 jaar. De incidentie van de ziekte neemt met de leeftijd toe.
- *Leeftijd van menarche en menopauze*: Vroege menarche en laattijdige menopauze zijn positief gecorreleerd met het risico op borstkanker.
- *Geografische factoren*: De incidentie is het hoogst onder de blanke bevolking van Noord-Amerika en West-Europa, de laagste incidentie vindt men in Azië.
- *Voorgeschiedenis van goedaardige borstaandoeningen*: Bij een voorgeschiedenis van epitheliale hyperplasie, papillomatosis of adenosis neemt het risico toe met een factor van 1,5-2.

- *Genetische voorbeschiktheid*: Ongeveer 5-8% van alle mammacarcinomen is het gevolg van genetische voorbeschiktheid. Voornamelijk mutaties in het BRCA-1-gen (chromosoom 17) en in het BRCA-2-gen (chromosoom 13) zijn hiervoor verantwoordelijk (17).

De beïnvloedbare risicofactoren op het krijgen van borstkanker zijn pariteit en leeftijd bij de eerste zwangerschap, ioniserende straling, alcoholgebruik, obesitas en hormonale medicatie.

- *Pariteit en leeftijd bij de eerste zwangerschap*: Vrouwen die in hun leven nooit bevallen zijn ook wel nullipara vrouwen hebben een hoger risico op borstkanker dan vrouwen die al meerder keren bevallen zijn (multipara vrouwen). Daarenboven verhoogt een eerste zwangerschap op latere leeftijd het risico op borstkanker.
- *Ioniserende straling*: Bloostelling van de mammae op jonge leeftijd aan ioniserende stralen (1-3 Gy) verhoogt het risico op mammacarcinoom.
- *Alcohol*: Alcohol verhoogt het risico op kanker.
- *Hormonale medicatie*: Het langdurig gebruik (meer dan tien jaar) van hormonale anticonceptiva door jonge vrouwen (< 35 jaar) zou een lichte toename van het risico op borstkanker met zich meebrengen (17).

2.4 EMT bij borstkanker

Indien men EMT merkers, of anders gezegd eiwitten die een rol spelen bij EMT, zou gebruiken als prognostische parameter kan dit ons veel informatie geven over de ernst en prognose van kanker. Het EMT proces zorgt er namelijk voor dat kankercellen naar aanliggende regio's of op verre organen metastaseert. Wanneer een metastase uitgezaaid is naar andere organen geeft dit een minder goede overlevingskans/prognose dan wanneer de borstkanker niet is uitgezaaid.

Om de prognose van kanker te bepalen zijn er modellen uitgevonden om tumoren in te delen. Tumoren kunnen onderverdeeld worden op basis van de "Tumor Nodes Metastases" classificatie (TNM classificatie). De T staat voor de Tumorgrootte, de N voor de aanwezigheid van tumoren in regionale klieren en de M voor metastase op afstand. De tumorgrootte wordt in vier klassen onderverdeeld. Bij T_1 is de tumorgrootte maximum 2cm, bij T_2 varieert de tumorgrootte tussen de 2-5cm en bij T_3 is de tumorgrootte groter dan 5cm. T_4 is onafhankelijk van de tumorgrootte, maar beschrijft of de tumor zich uitbreid naar de huid (ulceratie of nodule) of borstkas (20).

Naast de klassieke TNM classificatie kan men de patiënt indelen in verschillende stadia van borstkanker. Een patiënt met stadium 0 borstkanker heeft een gemiddelde 5-jaars overleving van 100%. Bij een stadium 0 borstcarcinoom is de tumor nog in situ (T_{cis}), dit betekent dat het nog niet is gemetastaseerd doorheen de basale membraan. Een patiënt met stadium 1 borstkanker heeft een gemiddelde 5-jaars overleving van 98%. Hoe groter het stadium hoe slechter de overleving. (19)

Tabel 1: Borststadium en overlevingspercentage na 5 jaar (19)

Stadium	Overlevingspercentage na 5 jaar
Stadium 0 ($T_{cis}N_0M_0$)	100%
Stadium I ($T_1N_0M_0$)	98%
Stadium IIA ($T_{0-1}N_1 \cdot 0$, $T_2N_0M_0$)	88%
Stadium IIB ($T_2N_1M_0$, $T_3N_0M_0$)	76%
Stadium IIIA ($T_{0-2}N_2 \cdot 0$, $T_3N_{1-2}M_0$)	56%
Stadium IIIB ($T_4N_{0-2}M_0$)	49%
Stadium IV ($T_xN_xM_1$)	16%

Uit tabel 1 kan men vaststellen dat hoe erger het stadium van de borsttumor is, hoe kleiner het overlevingspercentage wordt. Tumorgroei, lymfeklierverspreiding en metastase hebben een nadelig effect op de overlevingskans van de vrouw.

Een belangrijk gegeven bij borstkanker is dat niet alle patiënten dezelfde eiwitten vrijstellen ze bevatten dus een typisch gen expressie profiel ("gene expression profile"). Zo heeft iedere dame met borstkanker een uniek genexpressie profiel. Aan de hand van de graad van genexpressie kan men borstkanker opdelen in verschillende subtypes. Dit verklaart waarom sommige chemo's geschikt zijn bij het ene subtype van borstkanker en bij het andere subtype niet geschikt zijn.

Het opsporen van EMT bij een patiënt met borstkanker zou een interessante merker zijn voor de metastase. Daarom wordt er in deze literatuurstudie een relatie nagegaan tussen de verschillende targetgenen en pathways betrokken bij EMT in kanker. Aan de hand daarvan kan men bepalen welke molecuul/eiwit de ideale merker kan zijn voor EMT bij kanker metastase op te sporen. Vervolgens wordt het verloop van metastase onderzocht. Het

bespreken van het gen expressie profiel met de opdeling van de verschillende subtypes van borstkanker wordt als slotonderwerp gehouden in deze masterproef. In deze laatste topic wordt ook de behandeling van borstkanker besproken.

3. Methodologie

Vooraleer de echte literatuurstudie aan te vatten was het nuttig om basisinformatie over EMT en borstkanker op te zoeken. Deze zoektocht naar informatie gebeurde voornamelijk in de database Pubmed. Pubmed is een medische database waarbij artikelen gekenmerkt worden door een aantal trefwoorden. Deze trefwoorden worden in de database Pubmed als Mesh-termen geklasseerd. Aan de hand van combinaties van mesh-termen kan men een zoekstrategie uitbouwen. De mesh-termen die gebruikt werden om informatie te verkrijgen over EMT en borstkanker waren 'epidermal to mesenchymal tranversion' en 'breast neoplasion'.

Aan de hand van interessante artikelen werd via related citations gezocht naar gelijkaardige artikels. Zo kon er op een efficiënte manier veel artikelen verkregen worden. Voor de inleiding werden verschillende zoektermen gebruikt. Deze waren 'epithelial plasticity', 'EMT in Embryonic Development', 'EMT and MET in Cancer', 'classification of EMT', 'EMT associated with tissue regeneration'. Verder was het ook interessant om de epidemiologische en risicofactoren over borstkanker te verkrijgen. Dit werd opgezocht in het 'Handboek gynaecologie' van Prof Dhont.

De thesis zelf bestaat uit 3 verschillende delen. Het eerst luik bevat de bespreking van de targetgenen en pathways van EMT bij kanker. Hierbij werden volgende termen gebruikt als zoekstrategie: 'molecular and pathological signatures of EMT', 'EMT transcription factors' 'EMT microRNAs', 'tumor microenvironment initiate EMT'. Het tweede luik omvat de bespreking van het proces van metastase bij borstkanker. Hierbij werden volgende termen gebruikt: 'Targets of breast cancer metastasis', 'local invasion of breast metastasis', 'circulation of breast metastasis' en 'extravasation of breast metastasis'. Het laatste deel van de thesis onderzoekt de genexpressie bij borstkanker met de mogelijke therapeutische strategieën. Hier zijn de zoektermen: 'gene expression profile breast cancer', 'EMT as predictor of clinical outcome in breast cancer' en 'EMT breast cancer therapy'.

Bij de zoekstrategieën werden volgende filters gebruikt: de artikels mogen maximum 5 jaar oud zijn en het gebruik van reviews.

Bij het zoeken van artikelen heb ik gelet dat de review interessant waren en bruikbaar voor mijn thesis.

4. Resultaten

4.1 Moleculaire pathways bij de verschillende EMT klasse 's

4.1.1 Gen pathway bij EMT type 1 en type 2

De gen pathway's bij type 1 EMT en type 2 EMT zijn gelijkaardig met deze van EMT type 3. Daarom werd er verkozen om enkel de pathway van EMT type 3 te bespreken .

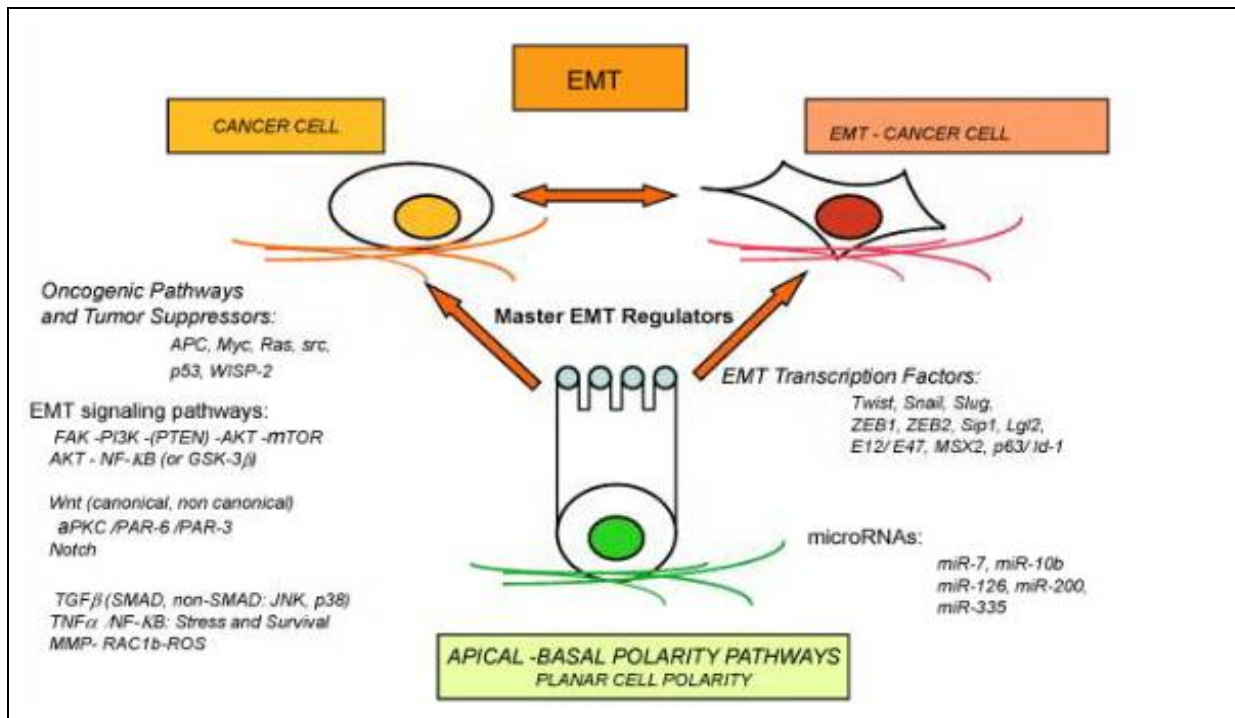
4.1.2 Regulators die een rol spelen bij EMT type 3

Het EMT proces bij kanker wordt geregeld door verschillende signaalcascadeeiwitten. In dit hoofdstuk worden de 4 belangrijkste besproken.

De regulators/pathways die instaan voor EMT bij epitheliale kankers zijn:

1. PI3K-AKT-mTOR of PAM patway
2. GSK-3 β /Wnt cascade
3. Cel polariteit regulatoren
4. microRNAs (21) (zie figuur 10)

Deze pathways zullen verschillende EMT transcriptiefactoren zoals Snail, Twist, Slug, ZEB1/ZEB2 en ook klassieke oncogenen en tumor suppressorgenen (APC, Myc, Ras, Src) activeren (21). Deze EMT transcriptiefactoren zorgen voor een repressie of verminderde expressie van het adhesieeiwit E-cadherine. Hierdoor komen de epitheelcellen los van elkaar en worden verder omgezet worden tot mesenchym cel.

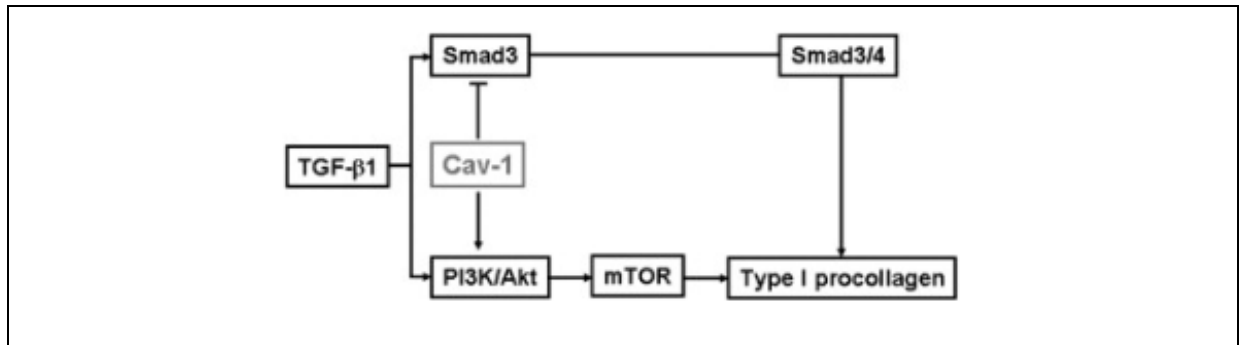


Figuur 10: Verschillende regulatoren die een rol spelen in EMT type 3. De EMT signalerende pathways en de oncogene/tumor supressor pathway spelen een rol bij de vorming van kankercellen. In een verdere fase gaan de EMT-transcriptiefactoren en microRNAs de kankercel omvormen tot een EMT gewijzigde kankercel (21).

4.1.2.1 PI3K-AKT-mTOR pathway (PAM pathway)

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/ AKT/mamalian target of Rifampicine (mTOR) pathway is een intracellulaire signalerende pathway die een belangrijke rol heeft in de celcyclus. Met celcyclus verstaat men celdeling en groei (22). Wanneer deze pathway in overmaat vrijgesteld wordt kan dit leiden tot activatie van EMT. Deze pathway werken onder andere met andere cellulaire pathways om EMT te doen activeren.

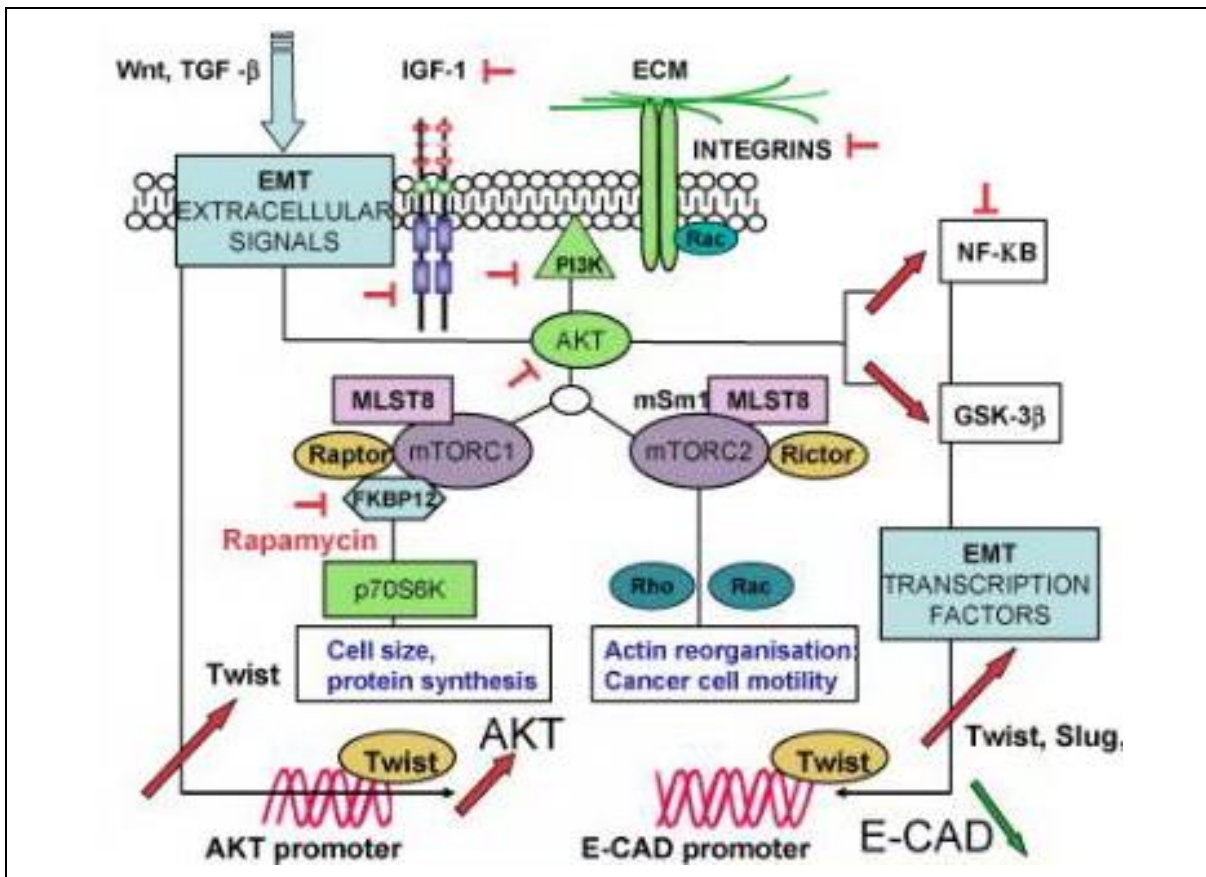
Een bijzondere rol is weggelegd voor Caveolin-1. Caveoline is een eiwit afkomstig uit een caveole, een vesiculaire invaginatie dat vaak in tumorcellen aanwezig is (21). Calveoline-1 verhoogt de expressie van type I collageen (zie figuur 11). Dit gebeurt door inhibitie van de TGF β /SMAD pathway en activatie van PAM pathway (23).



Figuur 11: Caveoline-1 zorgt voor stimulatie van de PI3K/AKT/mTOR pathway (23).

Calveoline-1 is in veel tumoren over gestimuleerd en zorgt dus voor een over expressie van de PAM pathway. (21). Niet alleen Calveoline-1 stimuleert de PAM pathway, ook extracellulaire EMT signalen zoals de GSK-3 β /Wnt-, TGF β /SMAD- en IGF-1 pathway bevorderen deze pathway (21). Wanneer het AKT eiwit geactiveerd is dan zullen volgende pathways worden bewerkstelligd (zie figuur 12):

1. mTORC1/p70S6kK pathway staat in voor cel expansie en cel regulatie
2. mTORC2/Rho-Rac pathway staat in voor het reorganiseren van actine en stimuleren van cellulaire invasiviteit
3. Stimulatie van NF- κ B en inhibitie van Wnt/GSK-3 β pathway. Dit wordt in het volgende deel (hoofdstuk 4.1.2.2 GSK-3 β /Wnt pathway) uitvoerig besproken.
4. Zelf-activerende lus: AKT zorgt voor de productie van EMT transcriptiefactor zoals Twist en Slug, via de GSK-3 β pathway. Twist is een AKT promotor, wat de AKT transcriptie bevordert. Hierdoor wordt er meer AKT vrijgesteld die opnieuw meer twist zal activeren. Dit leidt tot een positieve bekrachtiging van AKT/mTOR pathway (21).



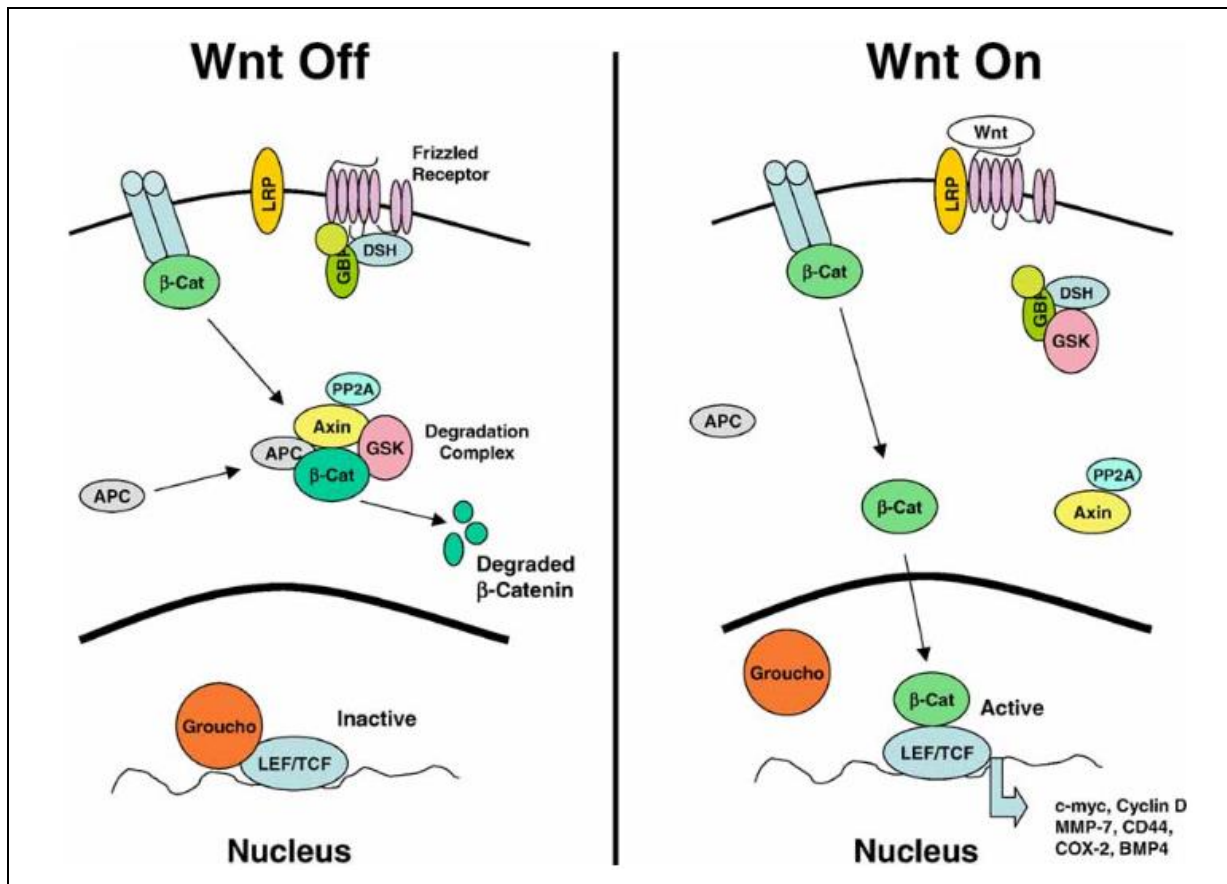
Figuur 12: EMT geregeld via de PAM pathway. Wnt of TGF- β gaan extracellulaire eiwitten activeren zoals calveoline. Calveoline zorgt voor de activatie van AKT. Het AKT eiwit gaat vier pathways gaan regelen, bestaande uit mTORC1, mTORC2, NF- κ B en GSK-3 β . De mTOR eiwitten zorgen voor celgroei en actine reorganisatie. Verminderde GSK-3 β zal voor een verminderde expressie van E-cadherine zorgen (21).

4.1.2.2 GSK-3 β /Wnt pathway

De GSK-3 β , of glycogeen synthase kinase 3 beta, speelt een rol in 2 verschillende pathways, de PAM pathway en de GSK-3 β /Wnt pathway. In voorgaande paragraaf zagen we hoe dat de PAM pathway het GSK-3 β eiwit inhibeert. Deze inhibitie van GSK-3 β eiwit leidt tot activatie van de Wnt pathway zonder Frizzled receptor activatie (zie verder) (21).

Er zijn 2 soorten Wnt signalerende pathways; de canonieke Wnt en de niet-canonieke Wnt. De canonieke Wnt pathway is β -catenine gevoelig terwijl de niet-canonieke Wnt pathway β -catenine ongevoelig is. De niet-canonieke pathway wordt hier niet besproken omdat dit geen verband heeft met EMT (24).

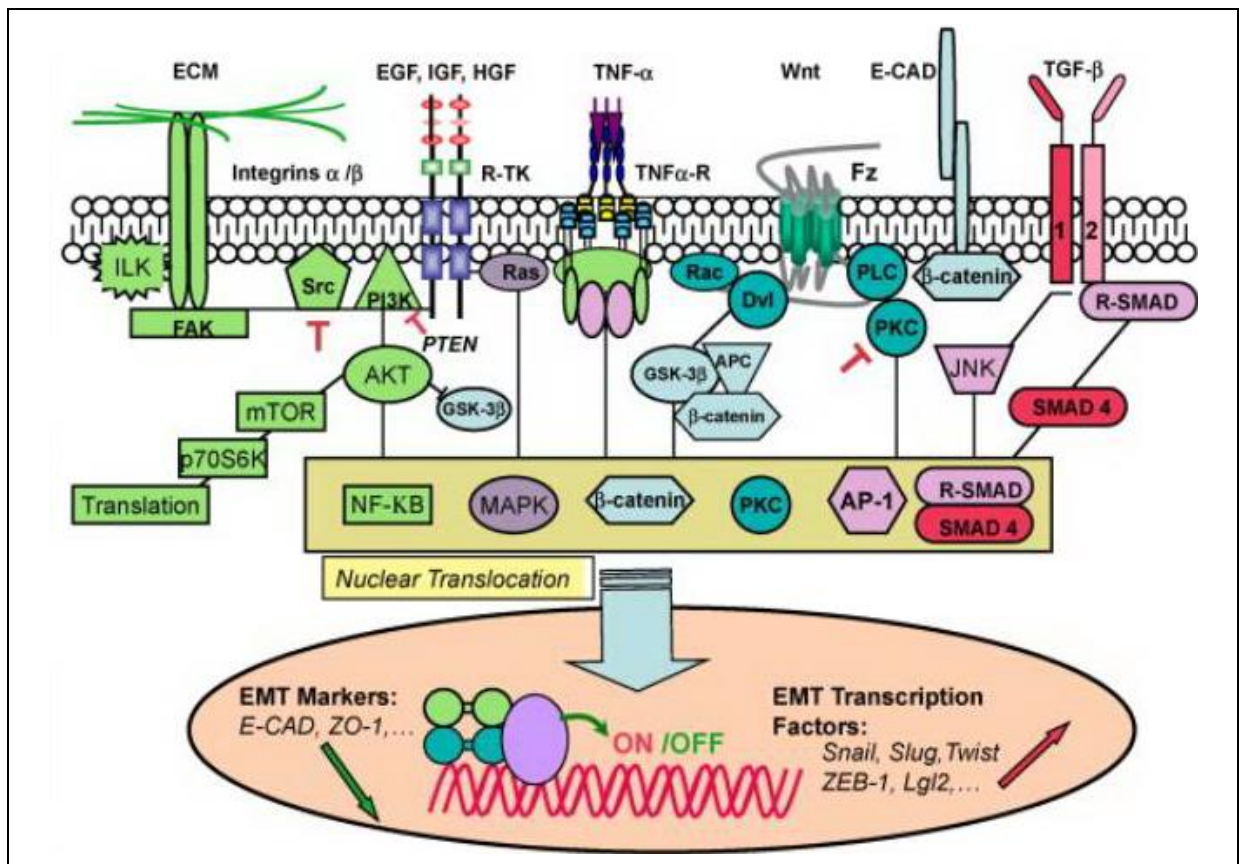
De Wnt canonieke pathway (zie figuur 13) kan geactiveerd worden door een binding van het Wnt ligand op de Frizzled receptor (Fzd). In de inactieve toestand zijn er geen Wnt liganden waardoor de Frizzled receptor niet geactiveerd wordt. In deze inactieve toestand wordt er een multi-subunit destructie complex gevormd. Dit is een groot eiwitcomplex samengesteld uit adenomateuze polyposis coli (APC), Axin, GSK3 β en CK1. Dit multi-subunit destructie complex' zorgt ervoor dat het gefosforyleerde β -catenine afgebroken wordt. Wanneer de Frizzled receptor geactiveerd wordt zal het Disheveled (DSH) eiwit in het cytoplasma vrijkomen en binden op GSK-3 β . Daardoor zal het GSK3- β eiwit niet functioneren en geen destructiecomplex vormen. Bijgevolg komt het β -catenine vrij en transloceert naar de nucleus waar het intraheert met de transcriptiefactor TCF/LEF, wat leidt tot transcriptie van c-myc, cyclin D en het activeren van EMT transcriptiefactoren (25). C-myc is een eiwit dat instaat voor celgroei, terwijl cyclin D instaat voor cel replicatie. Beide eiwitten zijn belangrijk in de verdere progressie van kanker.



Figuur 13: Wnt canonieke pathway. Wanneer er geen Wnt aanwezig is (Wnt off) dan zal het β -catenine eiwit vernietigd worden door het degradatiecomplex ook wel de multi-subunit destructie complex genoemd. Hierdoor kan het β -catenine niet binden met het promotoreiwit LEF/TCF, waardoor er geen transcriptie gebeurt. Wanneer Wnt aanwezig is (Wnt on), zal Wnt binden op de Frizzled receptor. Hierdoor zal het GSK-3 β bindend proteïne (GBP) en Disheveled eiwit (DSH) loskomen en binden met het GSK-3 β . Dit zorgt ervoor dat het β -catenine kan binden met het promotoreiwit LEF/TCF waardoor verschillende oncogenen worden overschreven (24).

Als we de belangrijkste cellulaire pathways van EMT samenvatten in een omvattende figuur (figuur 14) zien we dat er 6 oncologische eiwitten geactiveerd kunnen worden: NF- κ B, MAPK, β -catenine, PKC, AP-1, R-SMAD/SMAD 4. De PAM pathway zorgt voor stimulatie van NF- κ B. De RTK/Ras/MAPK pathway zorgt voor stimulatie van MAPK. En de GSK3 β Wnt pathway zorgt voor stimulatie van β -catenine. Deze eiwitten gaan welbepaalde oncogenen stimuleren die voor celgroei (vb. c-myc), celdeling (vb. cyclin-d) en degradatie van de ECM zorgen (vb. MMP-7). Bijkomend zullen deze eiwitten EMT transcriptiefactoren stimuleren. Voorbeelden van EMT transcriptiefactoren zijn Snail, Slug, Twist, ZEB-1 en Lgl2. Al deze transcriptiefactoren gaan de expressie van E-cadherine gaan onderdrukken. Dit betekent dat

ze de transcriptie van E-cadherine doen dalen. Dit heeft als gevolg dat er minder adhesie-eiwitten worden gevormd en metastase mogelijk gemaakt wordt (21).



Figuur 14: Samenvattende figuur van de extracellulaire en intracellulaire pathways betrokken bij EMT. De PAM pathway, de Ras/MAPK pathway, de GSK3 β /Wnt pathway en de TGF- β /SMAD pathway gaan specifieke eiwitten activeren. Deze eiwitten (NF- κ B, MAPK, β -catenine, PKC, AP-1 en R-SMAD/SMAD4) stimuleren op hun beurt de EMT transcriptiefactoren. De EMT transcriptiefactoren hebben een remmende werking op de aanmaak van eiwitten zoals E-cadherine en zona-occludens 1 (ZO-1) (21).

Het spreekt voor zich dat welbepaalde kankers specifieke EMT transcriptiefactoren stimuleren. Zo is geweten dat bij Colon kanker voornamelijk het ZEB-1 eiwit, een EMT transcriptiefactor overgestimuleerd is. Hierdoor is er verminderde aanmaak van het basale membraan Lgl2 eiwit (EMT merker), wat metastase bevordert. Bij borstkanker worden de EMT bio merkers (VIM, α -SMA, CK, E-cadherine en N-cadherine) geregeld via de EMT transcriptiefactor Snail (21).

4.1.2.3 Regulatoren van de celpolariteit

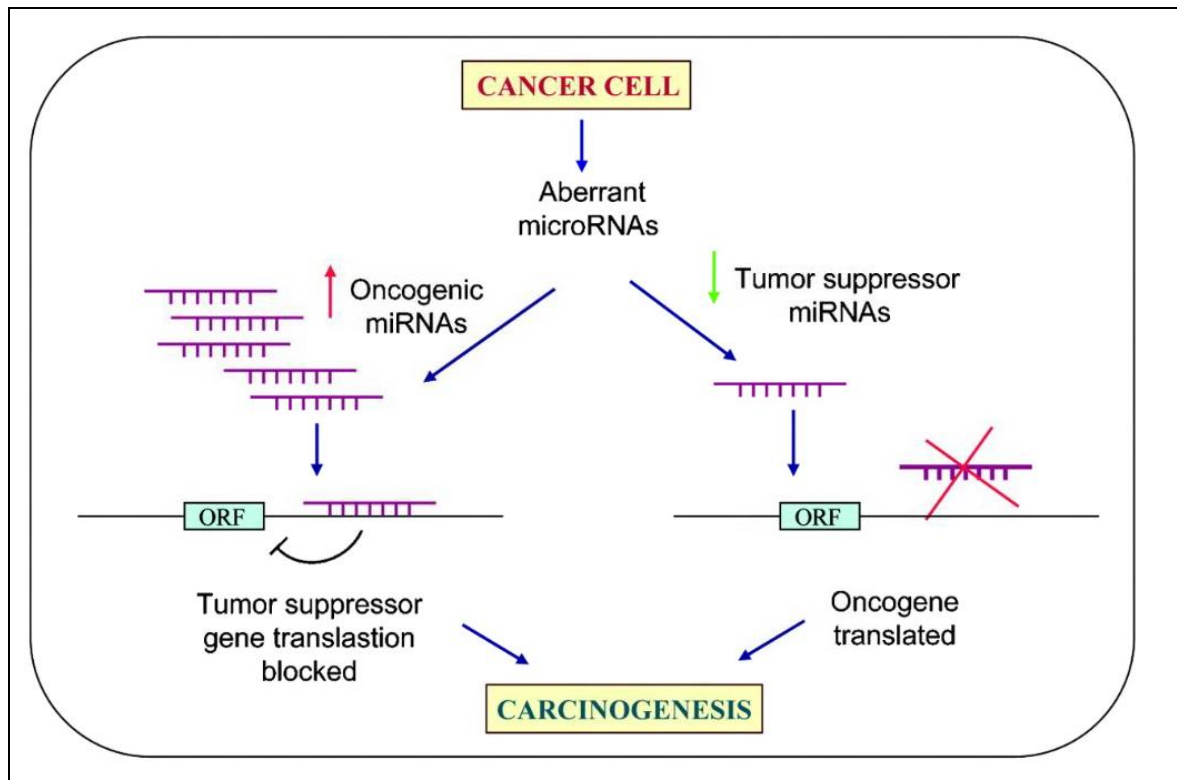
Epitheelcellen bevatten een apicale en basale kant (boven en een onderkant). Om deze polariteit in stand te houden bestaan er regulatoren. De regulatoren van de celpolariteit zorgen niet alleen voor juiste apicale en basale polariteit in de cel. Ze zorgen immers ook voor controle van de celproliferatie, epitheliale morfologie en vorming van junctionele complexen. Voorbeelden van celpolariteitregulatoren die een rol spelen in de EMT zijn atypische proteïne kinase C (aPKC) en PAR-6/PAR-3(21).

4.1.2.4 MicroRNA familie

MicroRNA's behoren tot een van de belangrijkste epigenetische processen. Epigenetische processen zijn mechanismen die genen kunnen aan- of uitschakelen. Dit mechanisme bepaalt dus in principe welke genen geactiveerd worden. Veel van deze mechanismen kunnen geregeld worden via omgevingsgebonden factoren zoals voeding en stress. Dit wijst erop dat er een link is tussen omgeving en genetica.

MicroRNA's zijn kleine interfererende RNA fragmenten, ook small interfering RNA (siRNA's) genoemd die specifieke genen onderdrukken. Deze siRNA's hebben het omgekeerde aminozuur volgorde van de mRNA van het specifieke gen, ook wel antisens genoemd. Wanneer deze siRNA op een mRNA kan binden kan de translatie niet meer plaatsvinden. De werking van miRNA's is een voorbeeld van post-translationele modificaties en heeft zijn toepassing gevonden in de antivirale afweer en embryologische ontwikkeling (26).

Deletie of amplificatie van sommige miRNA's genen kunnen aanleiding geven tot kanker (zie figuur 15). Zo kan amplificatie van oncogene miRNA's (grote hoeveelheden van deze miRNA's leidt tot kanker) zorgen voor een verminderde expressie van tumorsuppresserende genen. Deze miRNA's gaan op het openleesraam of open reading frame (ORF) van de tumorsuppresorgen binden en zorgen ervoor dat de transcriptie gehintereerd wordt. Oncogene miRNA's worden ook wel oncomirs genoemd afgeleid van oncogenen. Deletie van tumorsuppresserende miRNA's (miRNA's die een protectief karakter hebben) leidt tot toename in expressie van oncogenen. Normaal gezien gaan tumorsuppresserende miRNA's de transcriptie van oncogenen blokkeren, maar bij een tekort aan tumorsuppresserende miRNA zal de transcriptie van oncogenen wel gebeuren (27). De voorbeelden van een dergelijk tumorsuppresserende miRNA's zijn miR-126 en miR-335 die metastase remmen. Ze spelen onder andere een rol bij borstkanker metastase (21).



Figuur 15: De rol van miRNA bij de vorming van kanker. Een kankercel kan voor een veranderde productie van miRNA's zorgen. Wanneer een kankercel meer oncogene miRNA's produceert, gaat de expressie van tumorsuppressorgen geremd worden en zal dit leiden tot kankervorming. Dit gebeurt door binding van de oncogene miRNA's op het open leesraam (open reading frame, ORF) van de tumorsuppressorgen. Een kankercel die geen tumor supresserende miRNA's aanmaakt zal een verhoogde expressie geven van oncogenen. Dit komt omdat de tumor supresserende miRNA niet meer kan binden op het open leesraam van de oncogenen. Hierdoor zullen oncogenen niet geremd worden wat zal leiden tot kanker (27).

Voorbeelden van miRNA's die een rol hebben in EMT gestuurde borstkanker:

- *miR-10b*. Patiënten met borstkanker kunnen een overmaat aan oncogene miR-10b expressie hebben, waardoor het bijhorende tumorsuppresor gen wordt geïnhibeerd. Dit leidt tot bevordering van invasie en metastase. De miR-10b is gereguleerd via de EMT transcriptiefactor Twist.
- *miR-200 en miR-205 familie*. De miR-200 en miR-205 familie zijn tumor suppressieve miRNA's die voor de downregulatie van E-cadherine repressors ZEB1 en ZEB2 zorgen (21).

De oorzaak van de ontregeling van de verschillende pathways betreffende EMT mag men niet alleen zoeken bij mutaties en amplificaties van genen. Zo hebben cellulaire stress,

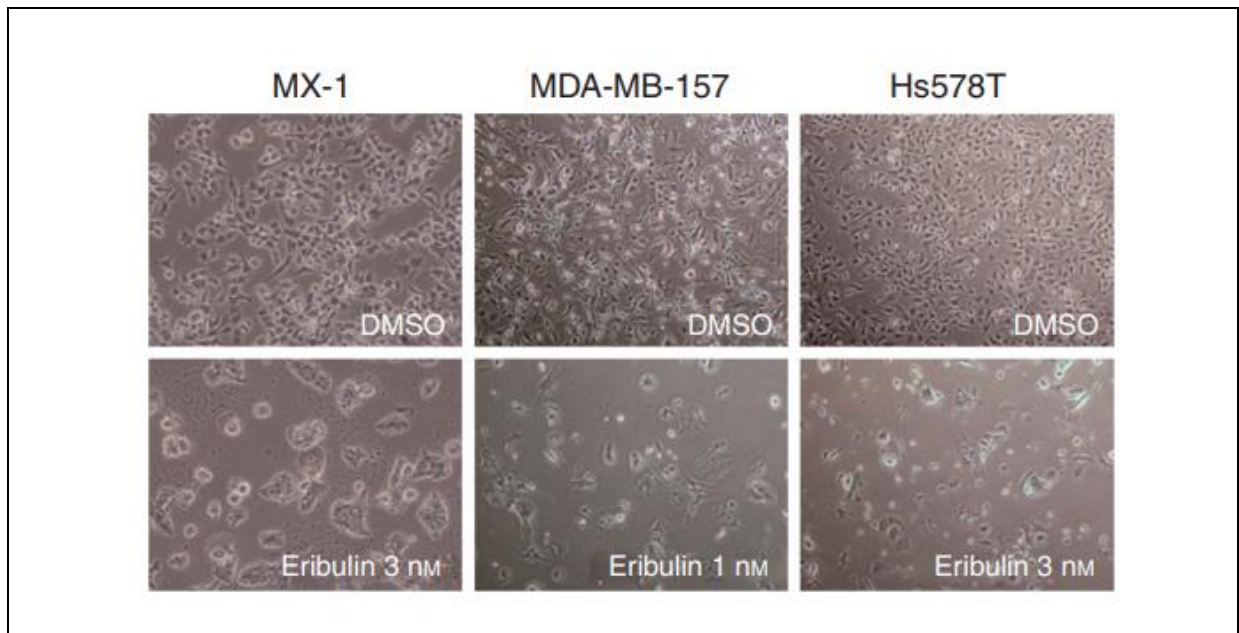
chronische inflammatie, fibrose en hypoxie een bevorderende rol in het EMT proces (21). De bespreking van deze verschillende pathways leidt ons echter te ver weg en wordt hier dus niet verder besproken.

4.1.3 Bestaat EMT nu echt?

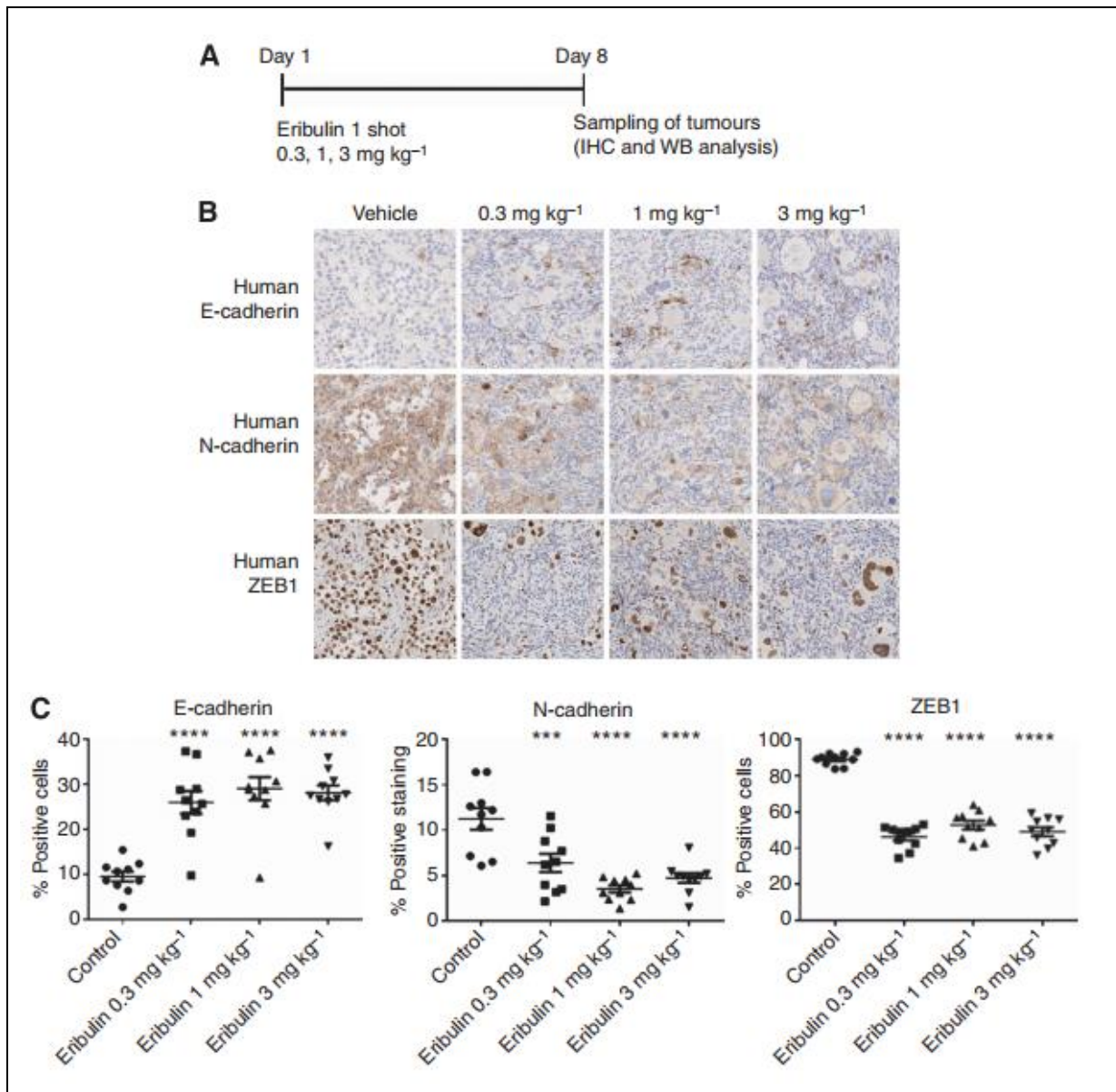
Veel wetenschappers twijfelen of EMT plaats vindt in kanker. De onzekerheid die wetenschappers hebben is te wijten aan de onbetrouwbare informatie van in vitro experimenten. Hoe kan een in vitro experiment een model geven over een fenomeen dat in vivo gebeurt? Er zijn nog veel te weinig in vivo experimenten gebeurd om EMT als een algemeen aanvaard feit te zien in kanker (28).

Een voorbeeld van een in vivo experiment bij muizen is de studie van Yoshida et al. In dit experiment werd onderzocht of Eribuline (microtubulus inhibitor) een anti-metastatisch effect zou hebben. Het anti-metastatisch effect zou gebaseerd zijn op het reversibel proces van EMT, waarbij gemetastaseerde cellen weer in een epitheel cel worden getransformeerd via MET. In de studie van Yoshida et al werden gemetastaseerde triple negatieve tumorcellen verzameld en daarbij 7 dagen lang eribuline gegeven. Om het MET proces in beeld te brengen werden twee testen uitgevoerd. De eerste test was een in vitro experiment waarbij tumorcellen in een petrischaal werden gefixeerd en 7 dagen lang Eribuline werd toegevoegd (zie figuur 16). De tweede test is een in vivo test waarbij in een muis één dosis van Eribuline gegeven werd (zie figuur 17). Na 7 dagen werd de expressie van EMT/MET markers (E-cadherine, N-cadherine en ZEB) gemeten (29).

De resultaten van het eerste onderzoek toonde een gewijzigde celmorfologie aan (zie figuur 16). De cellen vertoonden minder een spoelvormig morfologie maar hadden eerder een epitheliale morfologie. De tweede test toonde aan dat er een toename was van E-cadherine, een afname van N-cadherine en ZEB (figuur 17). Dit wijst erop dat de cellen een MET omvormingsproces ondergaan hebben (29). Verhoogde expressie van E-cadherine wijst op een verminderde graad van invasiviteit.



Figuur 16: In vitro experiment van TNBC (triple negatieve basale cellen) behandeld met eribuline (microtubulus inhibitor). Er werden drie verschillende celkweken genomen (MX-1, MDA-MB-157 en Hs578T) die elk behandeld werd met eribuline of met dimethylsulfoxide (DMSO). DMSO is een oplosmiddel dat de vorming van ijskristallen belet. De figuur toont de in vitro kweek na 7 dagen. Uit de figuur kan men zien dat de celkweken behandeld met eribuline een verandering van celstructuur hebben ondergaan. De auteurs van de studie vermelden dat de cellen geen spoelvormige structuur meer vertoonden, maar eerder een epitheliale structuur (29).



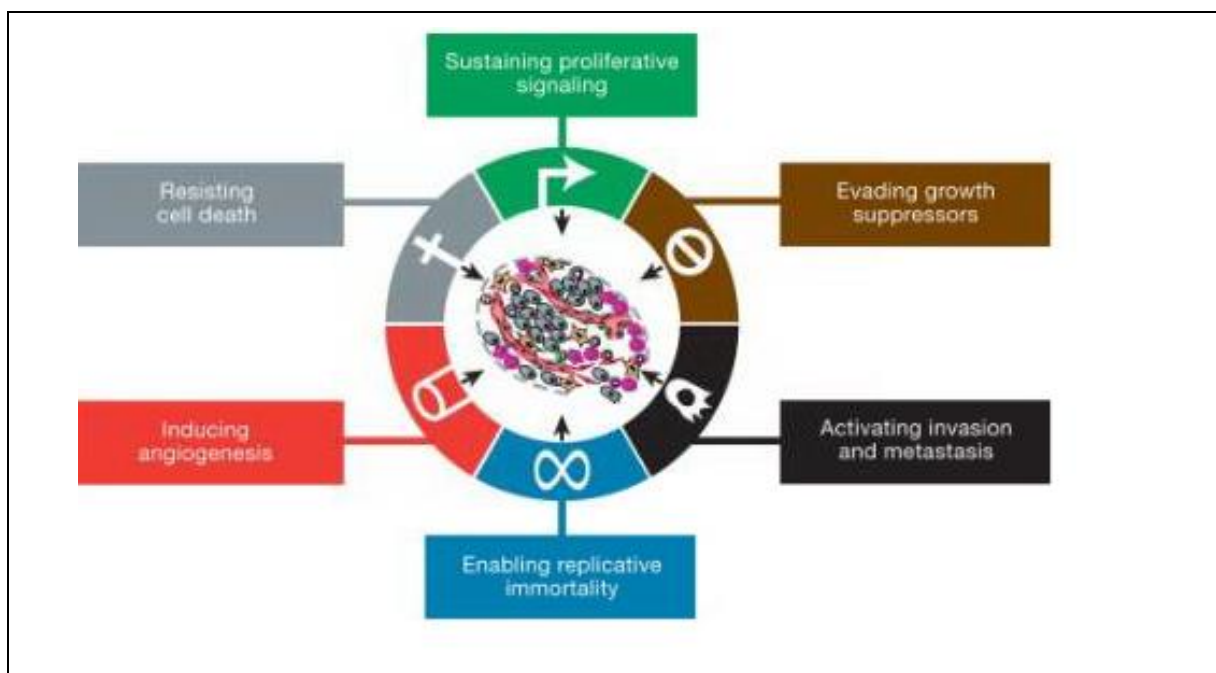
Figuur 17: In vivo experiment van muizen met vergevorderde TNC (triple negatieve cellen) behandeld met eribuline (microtubulus inhibitor). Na 8 dagen werden celbiopten genomen en via immunohistochemisch onderzoek werd de expressie van EMT markers gemeten. Er is een toegenomen expressie van E-cadherine en een afgenomen expressie van N-cadherine en ZEB eiwitten na behandeling met Eribuline (29).

4.2 Metastase proces

Het EMT proces wordt meer en meer gezien als een kankereigenschap (30). Daarom is het interessant om ook de andere kankereigenschappen op een rij te zetten. Hier hoort ook metastase bij en wordt in de laatste paragraaf verder in detail besproken.

4.2.1 Kankereigenschappen (Hallmarks of cancer)

Gezonde cellen hebben een gereguleerd evenwicht aan biologische signalen zoals groei- en apoptose. Dit zorgt ervoor dat cellen niet in overmaat gaan groeien. Echter hebben kankercellen een dysregulatie (onevenwicht) aan verschillende biologische signalen veroorzaakt door genomische instabiliteit. De verschillende biologische signalen van het kankerproces worden gebundeld als kankereigenschappen. Er bestaan tot nu toe 6 kankereigenschappen die instaan voor kanker, zijnde: aanhoudende proliferatie, ontbreken van groeisuppressieve signalen, onregelde celdood-/apoptose-mechanismes, ongelimiteerde celdeling, inductie van angiogenese en activatie van invasie en metastase (10)



Figuur 18: Kankereigenschappen (The Hallmarks of Cancer) (10)

4.2.1.1 Aanhoudende groei

Aanhoudende groei kan veroorzaakt worden door:

- *Oncogen activatie.*

Mutatie van een DNA-gen kan aanleiding geven tot continue productie van een welbepaald eiwit (oncogen). Dat eiwit zal celgroei doen stimuleren. Voorbeeld hiervan is mutatie van het B-RAF proteïne (onderdeel van RTK/RAS/MAPK pathway), dat het mitose activerende proteïne (MAP)-kinase pathway doet activeren. Hierdoor gaan verschillende oncogenen in overmaat tot expressie komen. (Zie figuur 14)

- *Verstoring van de negatieve feedbackloop.*

Meeste pathways die instaan voor groei worden gereguleerd door eiwitten die de pathways doen remmen. Dit wordt ook wel de negatieve feedbackloop genoemd. Wanneer nu deze beschermende factor uitgeschakeld wordt, ontstaat er aanhoudende groei. Een voorbeeld hiervan is de loss-of function mutatie van PTEN. Het PTEN eiwit inhibeert PAM pathway. Hierdoor ontstaat er een overproductie van oncoproteïnen. (Zie figuur 14)

Als de groei in de kankercel blijft aanhouden, moet de cel overgaan in geprogrammeerde celvernietiging, of apoptose. Kankercellen omzeilen deze cascade door ervoor te zorgen dat ze deze oncoproteïnen niet in overmaat gaan vrijstellen. Hierdoor ontstaat er geen apoptose en kunnen de kankercellen blijven toenemen in groei. (10).

4.2.1.2 Ontbreken van groei remmende signalen

Groeisuppressie of het remmen van groei wordt voornamelijk geregeld door het retinoblastoom-eiwit (RB) en TP53 eiwit. Het RB eiwit is een controle-eiwit dat bepaalt of de celdeling kan verdergezet worden. Het TP53 eiwit kan apoptose induceren (10).

Het ontbreken van groeisuppressieve signalen kan veroorzaakt worden door:

- *Contact inhibitie en evasie.*

Cellen die aan elkaar gehecht zijn verhinderen cel proliferatie. Wanneer een cel vrij is en niet meer verbonden is met andere cellen kan er proliferatie gebeuren. De inhibitie van celcontact wordt in verschillende kankers gezien. De meest voor de hand liggend voorbeeld is metastase. Hierbij zijn de cellen niet meer aan elkaar verbonden en leidt dit tot aanhoudende celgroei. Een ander voorbeeld van contactinhibitie is de secretie van het Merlin eiwit, dit is de cytoplasmatische vorm van het NF2 gen product. Merlin zorgt voor contact inhibitie van cellen.

- *Andere toepassing van de TGF- β pathway stimulatie*

Normaal gezien heeft TGF- β een tumorsuppremerende rol. Zo zullen bij goedaardige kankercellen de TGF- β ervoor zorgen dat de groei gestopt wordt. Dit in tegenstelling tot vergevorderde kankercellen waarbij TGF- β een oncogene rol heeft, namelijk het activeren van EMT (10). Dit wordt ook wel ook wel de TGF- β paradox genoemd. In bijlage 2 wordt de TGF- β paradox besproken.

4.2.1.3 Ontregelde celdood/apoptose mechanismen

Voorbeelden van ontregelde celdood/apoptose mechanismen:

- *Autofagie: kan zowel tumor overleving geven als celdood induceren.*

Autofagie kan zoals zowel TGF- β tumorsuppremerend werken als tumor inducerend. De juiste verklaring van dit werkingsmechanisme is nog niet geweten.

- *Necrose: heeft zowel een pro inflammatoire als tumor bevorderend potentieel.*

Het grote verschil tussen apoptose, autofagie en necrose is dat necrotisch celdood gebeurt via de vrijstelling van pro inflammatoire signalen terwijl dit bij apoptose en autofagie niet gebeurt. Hierdoor kunnen necrotische cellen inflammatoire immuun cellen aantrekken die het necrotische afval opruimt. Inflammatoire cellen kunnen de tumor activeren door stimulatie van angiogenese, cel proliferatie en invasiviteit. (10).

4.2.1.4 Ongelimiteerde celdeling mechanismen

Ongelimiteerde celdeling wordt bepaald door:

- *Ontbreken van replicerende senescentie.*

Tumorcellen maken telomerase aan, een gespecialiseerd DNA polymerase dat telomeer segmenten toevoegt aan de telomeren. Hierdoor kunnen cellen ongelimiteerd repliceren.

- *Vertraagde activatie van telomerase die zowel tumorprogressie stimuleren als tegenwerken.*

Het vertraagd activeren van telomerase heeft als effect dat er tumor promoverende mutaties ontstaan door vernietiging van de telomeren.

- *Telomerase reverse transcriptase (TERT).*

Het telomerase enzym bevat verschillende sub-units waaronder de telomerase reverse transcriptase (TERT). Het TERT eiwit kan niet alleen DNA schade herstellen maar kan ook de Wnt pathway activeren. Dit komt omdat het TERT eiwit een cofactor is van de β -catenine transcriptiefactor complex. Andere functies van het TERT eiwit zijn het stimuleren van cel proliferatie en resistentie van apoptose (10).

4.2.1.5 Inductie van angiogenese mechanismen

Angiogenese van tumoren gebeurt via de angiogenetische switch. Dit is de omschakeling van een situatie waarbij bloedvaten niet worden aangemaakt in een situatie waarbij bloedvaten continu wordt aangemaakt. Deze angiogenetische switch is nodig voor de bloedtoevoer bij groeiende tumoren (10).

Inductie van angiogenese wordt bepaald door:

- *De gradatie van angiogenetische switch.*
Sommige tumoren zijn hypogevasculeerd (vb. een hooggradig pancreatisch ductaal adenocarcinoom), terwijl andere tumoren hypergevasculeerd zijn (vb. renaal neuro-endocrine carcinomen). De regulatie van angiogenese wordt bepaald door angiogenetische groeifactoren zoals *Ras* en *Myc*.
- *Angiogenetische inhibitors.*
Voorbeelden van Angiogenetische inhibitors zijn thrombospondin-1 (TSP-1), fragmenten van plasmine en type 18 collageen (endostatine). Deze eiwitten remmen de tumorgroei.
- *Pericyt.*
Een pericyt cel is een soort steuncel die dicht gelegen is aan de oppervlakte van de endotheelcel. Pericyten hebben een belangrijke rol in de neovascularisatie van meeste tumoren.
- *Beenmerg afgeleide cellen.*
Beenmerg afgeleide cellen zoals macrofagen, neutrofielen, mast cellen en myeloïde progenitor cellen zorgen ervoor dat de angiogenetische switch wordt gestimuleerd (10).

Zowel bij apoptose als bij senescentie heeft EMT een belangrijke rol (21).

De laatste kankereigenschap: 'Activatie van invasie en metastase' wordt in de volgende paragraaf besproken.

4.2.2 Activatie van invasie en metastase

Metastase kan via 3 verschillende manieren gebeuren. Eerst en vooral heb je de mesenchymale vorm die gebeurd via EMT. Vervolgens kan je ook een collectieve en een amoëboïde invasievorm hebben. De mesenchymale vorm is al besproken in de inleiding. Collectieve invasie is een nodule van kankercellen die in massa verplaatst wordt naar een aangrenzend weefsel. Collectieve invasie ziet men bijvoorbeeld bij een squameus cel carcinoma.

Een minder voorkomende vorm van metastase is de amoëboïde vorm. Hierbij gaan kankercellen morfologisch veranderen in een amoebe vorm. Dit heeft als voordeel dat ze gemakkelijker door de extracellulaire matrix kunnen glijden (10).

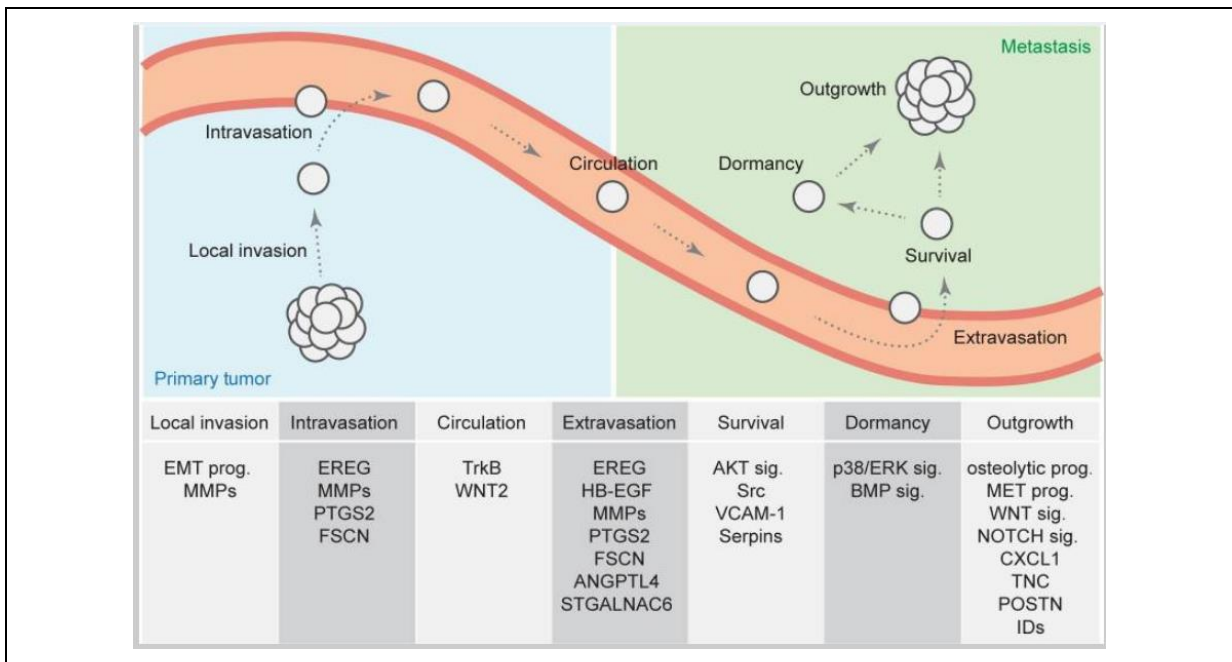
Een belangrijk stap in het metastaseproces is het down reguleren of inactiveren van adhesie moleculen. Adhesie moleculen zorgen ervoor dat cellen aan elkaar kunnen hechten. Wanneer tumorcellen deze adhesie moleculen niet meer aanmaken kunnen de cellen vrij bewegen en metastase ondergaan. Het inactiveren van adhesiemoleculen gebeurt door stimulatie van EMT-gelinkte transcriptiefactoren zoals Snail, Slug, Twist en Zeb1/2. Een welbepaald voorbeeld van adhesiemolecule is het E-caderine. E-caderine is een adhesie molecule dat adhesie juncties ("adherens junctions") vormt tussen de verschillende epitheliale cellen. Een verhoogde expressie aan E-caderine blokkeert het invasie- en metastase-proces, maar verminderde expressie van E-caderine bevordert het metastaseproces en leidt tot carcinoma 's. Anderzijds zijn sommige adhesie eiwitten gestimuleerd worden bij invasieve carcinoma 's. Een voorbeeld hiervan is het N-cadherine, dat normaal gezien enkel gestimuleerd wordt bij migrerende neuronen en mesenchymale cellen tijdens organogenese (10).

Naast de belangrijke intracellulaire veranderingen die een tumorcel ondergaat, zijn er ook extracellulaire wijzigingen die een rol spelen in het metastaseproces. Zo bevat het neoplastisch stroma, cellen die de metastase stimuleren. Een voorbeeld hiervan zijn de mesenchymale stamcellen (MSC) die CCL5/RANTES vrijstellen die de metastase activeert. Een ander voorbeeld zijn de macrofagen. Deze macrofagen worden door de kankercel geactiveerd door IL-4 productie. Macrofagen kunnen matrix degraderende enzymen vrijstellen zoals metalloproteinase en cysteine c. Hierdoor is het bindweefsel van de tumor vernietigd en kan de tumorcel vrij bewegen (10).

Metastase kan schematisch ingedeeld worden in verschillende stappen. Als eerste stap gebeurt er intravasatie, hierbij gaan kankercellen genetisch omswitchen van epitheel naar een mesenchymale vorm, ook wel EMT genoemd. Dit zodanig dat ze weefsels kunnen invaderen. Nadien gebeurt er een intravasatie van cellen in het bloed- of lymfevat. De cellen die terecht komen in het lymfatische of hematogeen systeem zullen zich verplaatsen naar verschillende organen en terechtkomen in een nieuw-parenchym. Dit laatste proces noemt men extravasatie. De uitgeweeke kankercel zal in eerste instantie kleine nodules vormen, die micrometastases wordt genoemd. In een latere fase zullen de nodules uitgroeien tot een macroscopische tumor, hierbij wordt de term kolonisatie gebruikt (10, 31).

Schematische vindt men dus:

- Lokale invasie
- Intravasatie
- Circulatie
- Extravasatie
- Micrometastase en uitgroei



Figuur 19: Schematische weergave van de metastase cascade met de belangrijkste eiwitten die hierbij een rol spelen (31).

4.2.2.1 Lokale invasie

Vooraleer tumorcellen de bloedbaan in kunnen gaan moeten ze een epitheliale-mesenchymale-transitie ondergaan. Dit leidt tot aanpassing van de celvorm en uitscheiden van enzymen die de Extracellulaire matrix vernietigen (ECM-degraderende enzymen). Hierdoor zal de tumorcel beter in de stroma en bloedwand migreren (31).

4.2.2.2 Intravasatie

De genen die instaan in het intravasatie-proces zijn de volgende (zie figuur 19): epiregulin (ERE), MMP-1, MMP-2, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2, ook wel COX-2 genoemd) en fascin (FSCN) (31).

4.2.2.3 Circulatie

Een normale cel die afgezonderd wordt van de extra cellulaire matrix (ECM) zal afgebroken worden doordat de cel geen overlevingssignalen krijgt van de omgevende cellen en stroma. Dit wordt ook wel anoikis-proces genoemd. Tumorcellen kunnen in de bloedbaan overleven doordat ze resistent zijn aan anoikis en het aangeboren immuun proces. De opgebouwde resistentie wordt veroorzaakt door een over expressie van het TrkB en WNT2 eiwit (31).

4.2.2.4 Extravasatie

Bij extravasatie worden dezelfde genen geactiveerd als bij intravasatie (31).

Tumorcellen kunnen naar verschillende plaatsen metastaseren. Afhankelijk van hun fenotype, die in het volgende hoofdstuk besproken wordt, zal de tumor in het bot, hersenen of andere vitale organen (longen) metastaseren (31).

4.2.2.5 Overleving

Oestrogeen receptor alfa ($ER\alpha+$) gevoelige tumorcellen gaan bij voorkeur in het bot metastaseren. Deze kankercellen ontvangen de eiwitten CXCL12 en IGF1 om de PAM pathway te doen activeren. Kankercellen die naar de longen zijn gemetastaseerd krijgen overlevingssignalen zoals VCAM-1 die weer op hun beurt de PAM pathway activeren. Triple negatieve tumoren metastaseren meestal naar de hersenen. De tumorcellen die naar de hersenen zijn gemetastaseerd zullen serpins vrijstellen, die de tumorcellen laten overleven (31).

4.2.2.6 Uitgroei

Tumorcellen die naar het bot zijn gemetastaseerd, zullen pro-osteolytische genen activeren die aanleiding geven tot osteoclasten activatie. Deze osteoclasten gaan het beenmerg afbreken en stellen vervolgens groeifactoren vrij die groeibevorderend zijn voor de tumorcel. Dit leidt tot een vicieuze cirkel waarbij de tumor groeit en osteocyten nog meer worden afgebroken. Het symptoom dat hiermee gepaard gaat is bot pijn, teken van fractures (31).

Bij pulmonaire metastase gaan de tumorcellen CXCL1 secreteren die myeloïde progenitor cellen aantrekken. Deze myeloïde progenitorcellen gaan S100A/B secreteren die de kankercel proliferatie bevorderen. Verder gaan stromacellen WNT en NOTCH uitscheiden die groeibevorderend werken (31).

Wanneer de tumorcellen in het doelorgaan terechtkomen, zullen deze tumorcellen omgevormd worden tot de epitheliale vorm. Dit gebeurt via een mesenchymale epitheliale transitie (MET).

4.3 Gen expressie profiel bij borstkanker

In dit hoofdstuk worden de verschillende subklasse 's van borstkanker besproken. Daarna wordt de EMT expressie vergeleken in deze verschillende subklasse 's. Ten slotte wordt nog de behandeling van borstkanker doorgenomen.

4.3.1 Verschillende klasse's van borstkanker

De onderverdeling van borstkanker gebeurt op basis van het type weefsel en de overlevingskansen van de patiënt. Om deze onderverdeling te maken is het belangrijk om kort de histologie van borstklierweefsel te bespreken. Het klierepitheel bestaat uit een luminale laag en een basale laag. De luminale laag bestaat uit normale epitheelcellen met junctionele complexen en apicobasele polariteit. Deze cellen stellen luminale merkers vrij zoals E-cadherine. De basale laag bestaat uit myoepitheliale cellen (12).

Borstkanker wordt in volgende subklasse 's onderverdeeld:

- *Normaal fenotype*
- *Luminaal fenotype*: Deze tumoren worden luminaal genoemd omdat ze fenotypisch dezelfde merkers vrijstellen (E-cadherine) en een gelijkaardige opbouw hebben als de luminale laag uit het klierepitheel. Verder stellen ze oestrogeen receptor alfa- (ER α +) en progesteron receptor (PR) vrij (12). Deze omvatten ongeveer 70% van alle borsttumoren. Het luminale fenotype wordt nog eens onderverdeeld in LUM-A en LUM-B subtypes. Luminaal B tumoren hebben een slechtere prognose dan LUM-A tumoren (31).
- *HER2+/ER α negatieve tumoren*: Deze tumoren hebben ERBB2/HER2 overexpressie. Deze groep omvat 10-15% van alle borstkanker casussen (31).
- *Basaal-achtige fenotype*: Deze tumoren stellen dezelfde eiwitten (EGF-R en p63) vrij als een normale myoepitheel/basale cel van de melkklier (21). Ze worden ook wel de triple negatieve (TN) borstkanker genoemd omdat ze negatief zijn aan oestrogeen receptor, progesteron receptor en HER2. Deze tumoren is de agressiefste vorm van borstkanker (31).

Iedere fenotype wordt veroorzaakt door een mutatie van welbepaalde DNA-genen. Echter, bevatten de 4 fenotypes genomische activatie van het PAM pathway. Activatie van het PAM pathway is een belangrijke eigenschap in de verdere progressie van borstkanker (31).

4.3.1.1 Luminaal fenotype

Borstkankercellen die een luminale fenotype hebben stellen oestrogeen receptor alfa ($ER\alpha$ +) vrij. In de literatuur wordt deze tumor ook vermeld als oestrogeen receptor alfa-gevoelige tumoren. Deze tumoren ontstaan door een mutatie in welbepaalde genen. Veertig procent van de $ER\alpha$ -gevoelige tumoren worden veroorzaakt door een mutatie van het PI3 kinase katalytische sub unit (PI3KCA) dat hierdoor de PAM pathway continu activeert. Zoals eerder gezien zorgt de PAM pathway voor groei, stimuleren van celdeling en het activeren van EMT. Andere genmutatie's die instaan voor $ER\alpha$ -gevoelige tumoren zijn loss-of-function mutaties van tumorsuppresorgen. Voorbeelden van tumorsuppresorgen die bij deze tumor wordt uitgeschakeld zijn TP53, GATA3, FOXA1, p38/JNK1, MAP3K1 en MAP2K4 en cel adhesie molecule (CDH1) (31).

Oestrogeen receptor α -gevoelige tumoren metastaseren bij voorkeur naar het bot. De reden waarom dit type tumoren liever naar het bot metastaseren is omdat het bot veel oestrogeen bevat. Oestrogeen is een belangrijk hormoon dat instaat voor de btopbouw. Zonder oestrogeen zal het bot afgebroken worden en kan osteoporose ontstaan. Wanneer oestrogeen op $ER\alpha$ + bindt leidt dit tot tumorgroei en tumorexpansie (31).

4.3.1.2 HER2 gevoelige tumoren

De $ER\alpha$ -negatieve tumor of de HER2 subtype wordt voornamelijk veroorzaakt door een ERBB2 amplificatie. Anderzijds is er een kleine proportie van de HER2 subtype dat veroorzaakt wordt door een TP53 of PI3KCA mutatie. Het ERBB2 oncogen stimuleert het PAM pathway(31).

De $ER\alpha$ -negatieve tumoren metastaseren naar de hersenen. Dit komt doordat de hersenen mindere immunologische cellen bevatten dan de rest van het lichaam (31).

4.3.1.3 Basaal-achtige fenotype

De Basaal-achtige tumoren of de triple negatieve (TN) tumoren worden hoofdzakelijk veroorzaakt door een mutatie in het tumorsuppresor gen TP53. Het TP53-eiwit is een belangrijk eiwit voor DNA-herstel. Verlies van dit eiwit kan leiden tot meer mutaties, zoals het BRCA1 mutatie (31).

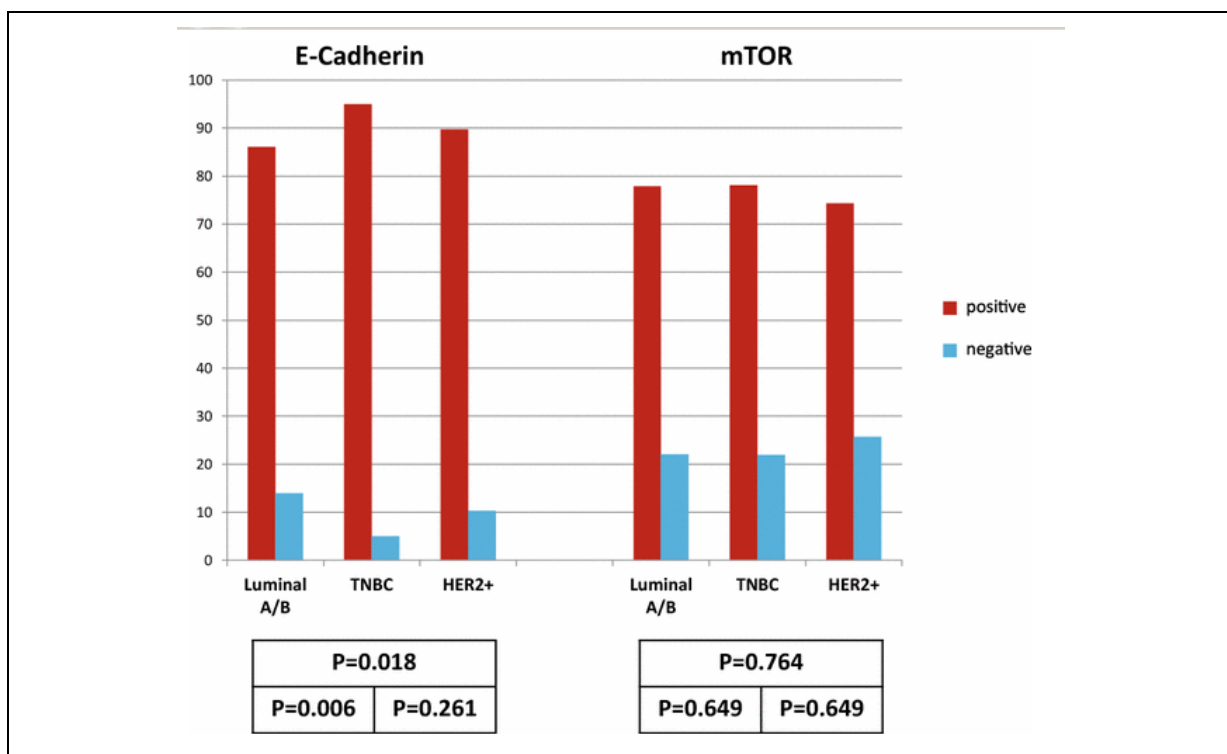
De TN tumoren metastaseren vooral naar vitale organen zoals hersenen en longen (31).

4.3.2 Verschil in expressie van EMT bij de verschillende borstkanker klasse's

In de studie van Pomp et al onderzocht men de EMT gemedieerde expressie in 3 verschillende subklasse 's van borstkanker. Met andere woorden, expressie van E-Cadherine en mTOR (twee EMT merkers) werden vergeleken in de verschillende subklasse 's van borstkanker. Hiervoor werden gegevens van 617 patiënten uit Zwitserland gebruikt. De drie subklasse 's waren lumaal A/B, TN basale cellen en HER2+ cellen (32).

De resultaten van de studie waren als volgt:

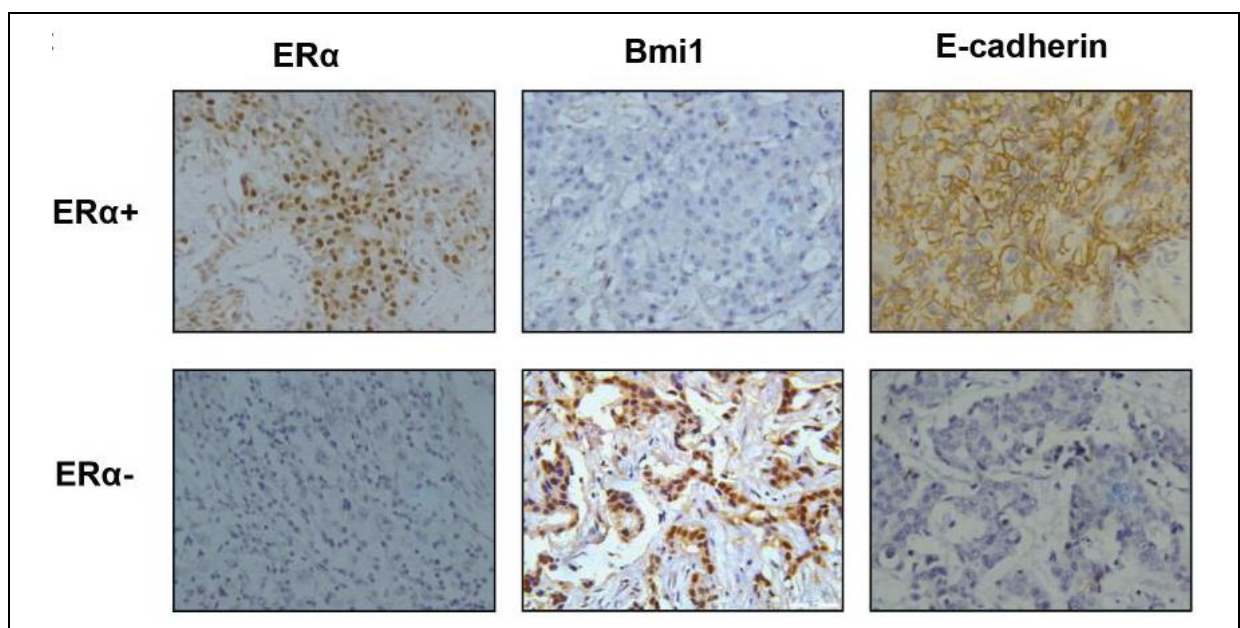
- De expressie van E-cadherine was ongeveer evenveel aanwezig in TNBC als in HER2+cellen. Echter was er een significant verschil van E-cadherine expressie in Luminal A/B subgroep vergeleken met de twee andere subgroepen (32).
- In alle drie de subgroepen waren geen significant verschillen wat betreft de mTOR expressie (32).



Figuur 20: Expressie van E-cadherine en mTOR in drie verschillende subklasse 's van borstkanker (32).

Zij haalden aan dat het verschil in E-cadherine verklaard kan worden door verschillende eigenschappen van lumaal en TNBC te hebben. Lumaal kankers hebben een invasie-

rijker fenotype dan de twee andere subklasse 's. Hierdoor wordt het EMT meer geactiveerd en wordt er minder E-cadherine vrijgesteld, waardoor metastase kan bekomen worden (32). Deze conclusie staat haaks met de studie van Wei et al. Zij stelde vast dat verhoogde ER α + borsttumoren voor een lagere invasiegraad zorgt. Dit is het gevolg dat de oestrogeen receptor alfa de Bmi-1 promotor doet inhiberen (33). Het Bmi-1 eiwit behoort tot de groep van polycomb group (PcG) eiwitten. Dit zijn eiwitten die inwerken op het niveau van epigenetica, meer bepaald het zijn eiwitten die specifieke genen zoals E-cadherine doen inactiveren (34). Verminderde Bmi-1 zorgt voor een verhoogde E-cadherine productie. Concreet gaan de ER α + tumoren voor een verhoogde E-cadherine expressie zorgen wat een negatieve invloed heeft op het EMT-proces en dus protectief is. Op de vraag: "Welke studie nu al dan niet juist is?", kan geen eenduidig antwoord gegeven worden. Algemeen is het wel zo dat ER α + tumoren een beter overlevingsrisico hebben. Bovendien kan de studie van Wei et al een verklaring aanbieden waarom de ER α + tumoren deze eigenschap hebben (33). Hieruit leiden we af dat er nog geen eensgezindheid is in verband met E-cadherine expressie bij ER+ cellen/ lumenale cellen.



Figuur 21: Het verband tussen ER α , Bmi1 en E-cadherine. Een borstumor gevoelig aan ER α + cellen zal op immunohistochemisch onderzoek een negatieve expressie (blauwe kleur) hebben aan Bmi1 en een positieve expressie (bruine kleur) van E-cadherine. Terwijl een borstumor negatief aan ER α gaan bij immunohistochemisch onderzoek een positieve expressie hebben aan Bmi1 en een negatieve expressie van E-cadherine (33).

4.3.3 Algemene behandeling van borstkanker en geneesmiddelenresistentie op basis van EMT activatie

De behandeling van borstkanker gebeurt op drie niveaus: lokaal, locoregionaal en systemisch. Eerst en vooral wordt de tumor lokaal weggenomen. Vervolgens wordt er radiotherapie gegeven als preventie, zodanig dat de omgevende cellen niet omgevormd kunnen worden tot kankercellen. Als laatste kan men indien nodig systemisch gaan behandelen met o.a.: hormonale therapie, chemotherapie en targeted therapie (17).

In de praktijk gebeurt dit als volgt: Een vrouw met een knobbel in de borst zal na onderzoek doorverwezen worden voor een mammografie. Als de mammografie kwaadaardige kenmerken zoals: calcificaties en een abnormale vorm, vertoont dan zal de tumor weggenomen worden en radiotherapie gegeven worden. Bijkomend zal de tumor verder microscopisch onderzocht worden. Bij dit pathohistologisch onderzoek zal men letten of de snijranden tumorvrij zijn en welke merkers positief zijn. Zodanig kan men de tumor in het juiste subtype van kanker indelen. Bijkomende onderzoeken zijn belangrijk om te bepalen of de tumor al gemetastaseerd is naar rondliggende weefsels of nog meer op afstand om zo de TNM classificatie te bepalen. Het onderzoek dat men gebruikt om metastase op te sporen bij rondliggend weefsel is sentinel-kleirbiopsie. De sentinclklier is de eerstvolgende klier waar de tumor zal metastaseren. De onderzoeken die bepalen of er metastase op afstand hebben plaatsgevonden gebeuren via beeldmateriaal zoals botscan, echo lever en CT thorax. Aan de hand van deze informatie kan de TNM classificatie opgemaakt worden en zal er ingeschat worden of er adjuvante therapie al dan niet nodig is. Indien tumorectomie niet haalbaar is wordt de volledige borst weggenomen, dit wordt ook wel mastectomie genoemd (17).

Om te bepalen of er systemische behandeling zoals adjuverende (hulptherapie) hormonale/chemotherapie nodig is, hangt af van volgende prognostische factoren:

- *Tumorgrootte*
- *Nodale status*
- *Differentiatiegraad*
- *Hormoonreceptorstatus (HR): ER en PR*
- *Jonge leeftijd (<35j)*
- *Vasculaire invasie*
- *HER2/neu-overexpressie*

Op basis van deze prognostische factoren wordt het risicoprofiel van een patiënte bepaald en de keuze van adjuvante hormoon/chemotherapie op afgestemd. Borstkanker is een

hormoongevoelige tumor, bijgevolg zal het uitschakelen van de ovariële hormonen de borstkanker gunstig beïnvloeden. Adjuvante chemotherapie zorgt voor het vernietigen van micrometastasen waardoor de kans op recidief en overlijden verkleind wordt (17).

De werkzaamheid van een chemotherapeutisch medicament wordt voornamelijk bepaald door de graad van resistentie. Er zijn twee soorten geneesmiddelenresistentie. De eerste soort resistentie is de intrinsieke resistentie, ten gevolge van voorbeschikkende factoren die waargenomen worden tijdens carcinogenese. Een voorbeeld hiervan is een verminderde immuniteit. De tweede soort geneesmiddelenresistentie is de verworven resistentie, bekomen door het geven van geneesmiddelen (35). EMT zorgt voor een belangrijke resistentie bij verschillende geneesmiddelen.

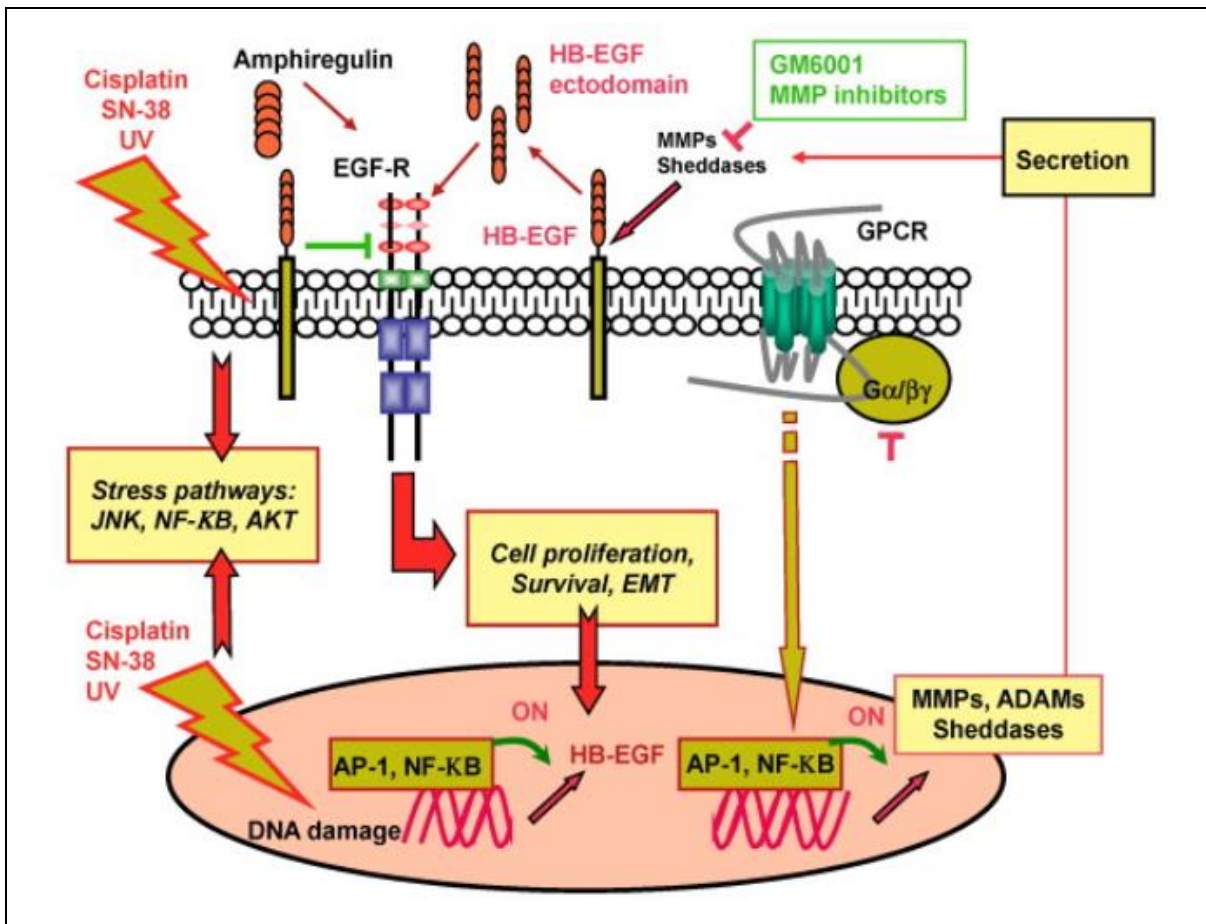
4.3.3.1 Taxol resistentie

Een chemotherapie die vaak gebruikt wordt bij de behandeling van borstkanker is taxol, een diterpenoïd gehaald uit taxus planten. Taxol remt de microtubulie-vorming waardoor de celdeling geïnhibeed wordt (36). Resistentie gebeurt op basis van EMT activatie, waarbij het EMT-transcriptiefactor Twist voor resistentie van taxol kan zorgen. Het is nog niet geweten hoe het resistentiemechanisme van taxol precies in elkaar zit. Wat men wel weet is dat activatie van PAM pathway een belangrijke rol heeft (21).

4.3.3.2 Cisplatinum resistentie

Cisplatinum is een chemotherapeuticum dat kan gebruikt worden voor borstkanker. Cisplatinum induceert DNA schade, waardoor de cel niet meer verder kan delen, en ze overgaat in apoptose (geprogrammeerde celdood). Uit onderzoek heeft men vastgesteld dat patiënten met borstkanker die EMT gemedieerde tumorcellen bevatten, minder gevoelig zijn voor Cisplatinum (35). Een mogelijke verklaring waarom EMT gemedieerde cellen ontsnappen aan cisplatinum wordt hier verder besproken.

Cisplatinum veroorzaakt DNA schade in de tumorcel. Hierdoor worden AP-1/NF- κ B transcriptionele regulatoren aangemaakt die instaan voor de aanmaak van het heparine-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) eiwit. Deze HB-EGF zal op zijn beurt EGF-R activeren wat leidt tot EMT activatie, cel-overleving en cel-proliferatie. Hierdoor wordt de functie van het cisplatinum geneesmiddel tegengewerkt (21).



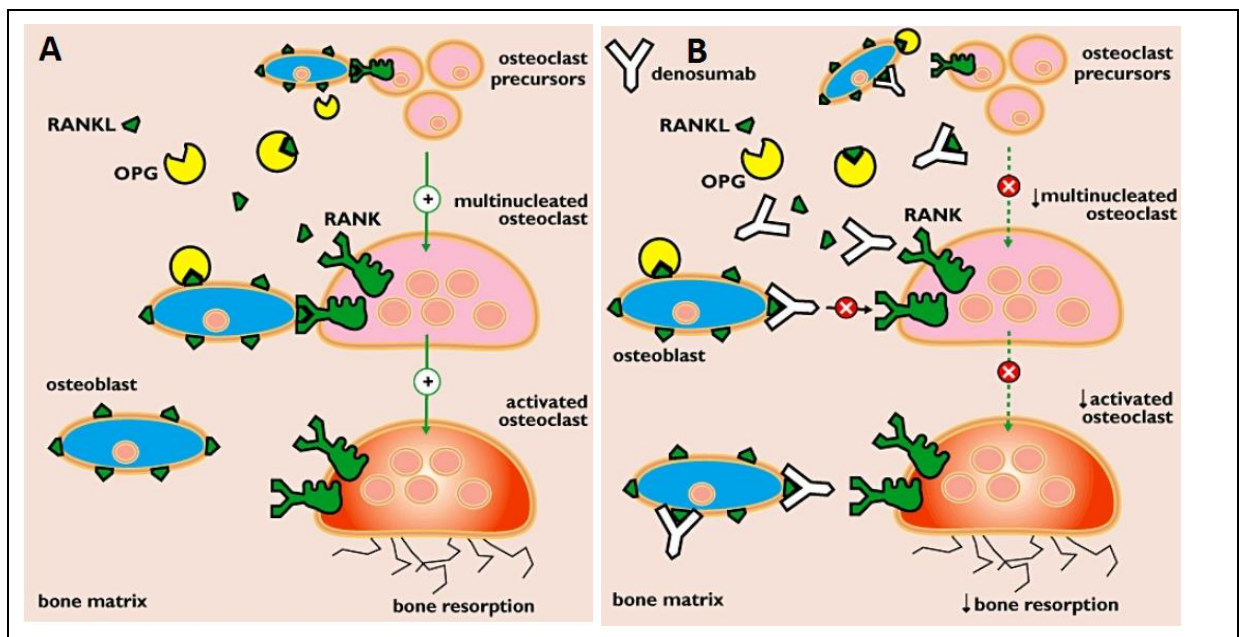
Figuur 22: Cisplatinum resistentie mechanisme (21).

Een groot nadeel van chemotherapie is dat het niet specifiek werkt. Er worden zowel kankercellen als gezonde cellen vernietigd. Hierdoor ontstaan er bijwerkingen zoals haaruitval, infectie, misselijkheid en braken. Wanneer men echter specifieke pathways gaat inhiberen, zullen de gezonde cellen minder aangetast worden en ontstaan er minder bijwerkingen.

4.3.4 Behandeling inwerkend op EMT pathways

De pathway's besproken in het eerste hoofdstuk kunnen via moleculaire blokkers geremd worden. In de praktijk bestaan er al moleculaire behandelingen voor volgende pathways: PAM pathway, RTK/RAS/MAPK pathway en de JAK-STAT pathway. Het remmen van deze pathways leid tot een verminderde tumorgroei en celdeling. Bijkomend zal EMT minder geactiveerd worden waardoor metastase geremd wordt (31).

Specifieke inhibitoren kunnen ook resistentie geven. Een voorbeeld hiervan is denosumab, een RANKL antilichaam dat gebruikt wordt bij botmetastase door ER α + gevoelige tumoren (zie figuur 23). Denosumab zal osteolyse inhiberen waardoor minder botresorptie ontstaat en metastase geremd kan worden. Dit middel werkt niet lang want na een tijdje wordt osteolyse op een alternatieve weg vervuld. Daarom worden deze geneesmiddelen gecombineerd met andere geneesmiddelen zodanig dat verschillende moleculaire targets geïnhibeerd worden. Bijvoorbeeld denosumab zal in de praktijk gecombineerd worden met hormonale therapie (31).



Figuur 23: Werking van Denosumab. In fig. 23 A ziet men de normale activatie osteoclasten die nodig is voor beenresorptie. Activatie van osteoclast gebeurt door binding van RANK receptor met RANK ligand gelen op de osteoblast. Osteoprotegrine (OPG) is een oplosbaar RANK receptor en zorgt voor inhibitie van osteoclast activatie. In Fig. 23 B ziet men dat het antilichaam denosumab het RANK ligand kan inhiberen (37).

5. Discussie en besluit

Uit deze literatuurstudie kan men het volgende besluiten: Epitheliale-Mesenchymale transitie (EMT) is een mogelijk verklaringsmodel voor het ontstaansproces van metastase. Echter is er nog niet genoeg evidentie om EMT als een oorzakelijk verband te zien voor metastase. Dit komt omdat er nog niet genoeg in vivo onderzoeken zijn gebeurd, waardoor EMT nog niet als een werkelijke kankereigenschap mag beschouwd worden. Alle bekomen informatie over EMT en kanker zijn nagenoeg gehaald uit in vitro experimenten. Hierbij werden gemetastaseerde kankercellen gekweekt en werden de EMT markers bepaald.

In deze masterproef werden verschillende aspecten van EMT en borstkanker onderzocht. Eerst en vooral werd EMT onderzocht op moleculair niveau. Meer bepaald werden de verschillende pathway's van EMT bij kanker bestudeerd. Hierbij werd geconcludeerd dat verschillende pathway's/regulators betrokken zijn in EMT bij kanker. De pathway's die in deze thesis besproken zijn: PAM pathway, de GSK-3 β /Wnt cascade, Cel polariteit regulators en microRNA's.

De EMT-signaliserende pathway's (PAM pathway en de GSK-3 β /Wnt cascade) gaan specifieke eiwitten aanschakelen die vervolgens op hun beurt oncogenen en EMT transcriptiefactoren stimuleren. Oncogenen staan in voor continue groei en proliferatie terwijl EMT transcriptiefactoren de transcriptie van welbepaalde eiwitten versterken of afzwakken. In het geval van borstkanker zal het EMT transcriptiefactor SNAIL de expressie van E-cadherine afzwakken. Hierdoor zullen epitheelcellen van elkaar loskomen en in de bloedbaan terechtkomen. De celpolariteit regulators bepalen de apico-basale vorm van een epitheelcel. Verlies of activatie van abnormale celpolariteit regulators leidt tot EMT. De laatste pathway die in de thesis besproken werd, was de ontregeling van microRNA. MicroRNA's zijn kleine niet coderende RNA strengen die antisens binden op de bijhorende mRNA strengen van een bepaald eiwit. Deze interactie leidt tot een inhibitie van het translatieproces van dat eiwit. MicroRNA's zijn dus in staat om de genen te activeren of inhiberen. Wanneer oncogene microRNA's in overmaat geproduceerd worden, kan dat leiden tot inhibitie van tumorsupressor genen en overactivatie van bepaalde oncogenen of EMT transcriptiefactoren, die kankervorming stimuleert. Omgekeerd gaat een deprivatie van tumorsupresserende microRNA die oncogenen juist doen remmen, opnieuw leiden tot overactivatie van bepaalde oncogenen of EMT transcriptiefactoren.

De rol van microRNA is maar één voorbeeld van epigenetica dat inwerkt op EMT. Uit verder literatuuronderzoek werden andere voorbeelden aangehaald van epigenetische wijzigingen bij EMT. Andere voorbeelden van epigenetische wijzigingen bij EMT zijn hypermethylering van 5'

CpGs eilanden in de CDH1 promotor, (dat instaat voor E-cadherine expressie), histonmodificatie, downregulatie van het metastasis tumor antigen 3 (MTA3) (dat instaat voor repressie van SNAIL expressie bij ER α - borstkankers) (38). Epigenetische wijzigingen hebben een belangrijk invloed op de stimulatie van EMT genen.

Het in kaart brengen van de verschillende pathway's die invloed hebben op EMT, zorgt ervoor dat er specifieke blokkers gemaakt kunnen worden tegen deze banen. Wanneer men dan een blokker ontwikkelt die bv. de AKT pathway kan inhiberen zal men die behandeling kunnen testen op muizen met een EMT gevorderde kanker. Deze in vivo experimenten geven bijgevolg een grotere graad aan evidentie betreffende EMT en kanker. Eventueel kan dit op een zodanig manier dat het EMT proces als iets werkelijk kan aanzien worden. Daarenboven kan het ontwikkelen van specifieke blokker de basis zijn voor een behandeling van gemetastaseerde kankers. Daarom is het van groot belang om verder onderzoek uit te voeren over de verschillende pathways.

In vivo experimenten hebben als nadeel dat ze een ethisch comité moeten doorlopen vooraleer ze als test mogen gebruikt worden. Het ethisch comité legt strengere voorwaarden op waardoor sommige onderzoeksvragen herformuleert moeten worden. Testen op menselijke embryo's zijn verboden en moeten vervangen worden door dierlijke embryo's. Hierdoor krijgt men een minder realistische antwoord op hoe een proces bij de mens gebeurd.

Als volgende onderdeel van de masterproef werd er onderzocht hoe het metastase proces verloopt bij borstkanker. Metastase is een onderdeel van de 6 verschillende kankereigenschappen. Metastase kan op verschillende manieren gebeuren: via EMT, collectieve en amoëboïde vorm. Metastase gebeurt in verschillende stappen: invasie, intravasatie, circulatie, extravasatie, micrometastase en uitgroei. In iedere fase worden er welbepaalde eiwitten vrijgesteld die de metastase positief bevordert. Metastase van borstkanker kan naar 3 specifieke organen verlopen, namelijk het bot, hersenen en andere vitale organen zoals longen. Oestrogeen receptor alfa positieve tumorcellen metastaseren bij voorkeur naar een plaats met veel oestrogeen zoals het bot. In tegenstelling tot Her2+ en triple negatieve tumorcellen die liever naar de hersenen metastaseren.

Het verband waarom HER2+ en TNBC tumorcellen liever naar de hersenen metastaseren werd onderzocht in volgende studies. In de studie van Jandial et al werd een overexpressie van Reeline gevonden bij HER2 gevoelige tumorcellen die naar de hersenen gemetastaseerd waren. Reeline is een neuronaal eiwit dat instaat voor neuronale differentiatie. Echter zal bij activatie van metastase Reeline zorgen voor celproliferatie en invasiviteit. Triple negatieve tumorcellen die gemetastaseerd zijn naar de hersenen vertonen deze expressie niet (39). In

de studie van Witzel et al werd het volgende aangegeven: triple negatieve tumorcellen vertonen een overmatige expressie aan nestine en promin-1 (CD133). Deze eiwitten zijn markers voor glioblastoma en hebben waarschijnlijk een rol bij de extravasatie van TNBC naar de hersenen (40).

Op basis van het fenotype van borstkanker zal de tumor naar een welbepaald regio metastaseren. Het verder onderzoeken van de signaleiwitten die daar een rol spelen, kan belangrijke informatie geven over mogelijke behandelingen bij gemetastaseerde tumorcellen. Daarom is verder onderzoek noodzakelijk om het overlevingsrisico van een gemetastaseerde borstkankerpatiënt naar omhoog te krikken.

Het laatste onderdeel van de masterproef was het onderzoeken van de verschillende genexpressie profielen bij borstkanker en de behandeling van borstkanker. Borstkankers worden klassiek ingedeeld in drie verschillende subtypen, namelijk: het lumbinale fenotype, HER2+ en basale fenotype. Borstkankercellen van het lumbinale fenotype stellen eiwitten vrij die dezelfde eigenschappen hebben als eiwitten uit de lumbinale laag van het klierpitheel. Lumbinale kankers zijn oestrogen gevoelig en worden ook wel het ER α + tumor genoemd. Lumbinale tumoren hebben een goed overlevingsrisico, omdat ze minder invasief zijn dan de Basale en HER2+ tumoren. De HER2+ tumoren stellen in overmaat HER2 vrij en gaan bij voorkeur de vitale organen zoals hersenen en longen metastaseren. Deze tumoren hebben een minder goede overlevingspercentage dan de ER α + tumoren. De basale tumoren worden ook triple negatieve borstumoren genoemd, omdat ze niet gevoelig zijn aan oestrogen, testosteron of HER2. Deze tumoren metastaseren bij voorkeur naar de hersenen en hebben de slechtste overlevingskansen. Verder werd de graad van EMT expressie in de verschillende subklasse 's van borstkanker vergeleken. De vaststelling is dat er nog geen eensgezindheid bestaat over de EMT expressie in de verschillende subklasse 's van borstkanker.

Er zijn verschillende studies die tegenstrijdig resultaten vertonen over de mate van EMT-expressie in de drie subklasse 's van borstkanker. De reden waarom er geen eensgezindheid is over de graad van EMT expressie komt door het simplistisch indelen van borstkanker in drie klasse 's. Sommige borstkankers zijn zowel oestrogen als HER2+ gevoelig en kunnen hierdoor zowel bij het lumbinale fenotype als bij HER2+ gevoelige tumoren ingedeeld worden. Het is belangrijk dat er verder onderzoek wordt gedaan naar specifiekere markers die de borstkanker in meerdere klasse 's kan onderverdelen, waarbij er geen overlap mogelijk is. Hierdoor zullen er betere conclusies gemaakt worden over de graad van EMT bij bepaalde borstkanker. Tegenwoordig worden de drie klasse 's nog verder

onderverdeeld in kleinere klasse (bijvoorbeeld HER2+/ER-/PR+) wat de zaken complexer en onoverzichtelijker maken.

Als laatste deel van de masterproef werden de verschillende behandelingen besproken bij borstkanker en de rol van EMT op de behandeling. De behandeling gebeurt op drie niveaus namelijk lokaal, locoregionaal en systemisch. Een tumor wordt dus eerst chirurgisch weggenomen (lokaal) gecombineerd met radiotherapie (locoregionaal) wat nadien gevolgd kan worden door hormonale of chemotherapie (systemisch). Sommige chemotherapeutica zoals taxol en cisplatina vertonen resistentie die opgebouwd worden door het mechanisme van EMT. Een andere soort van systemische therapie is targeted therapie of anders gezegd doelgerichte therapie. Dit zijn kleine moleculen die inwerken op bepaalde pathways. Zo bestaan er ook targeted therapie die inwerken op EMT gemedieerde pathway's. Deze therapieën hebben minder bijwerkingen dan chemotherapie maar ondervinden ook resistentie. Daarom worden targeted therapie gecombineerd met hormonale therapie

EMT kan leiden tot resistentie van verschillende chemotherapeutica. Zo is het belangrijk dat patiënten met een gemetastaseerde borstkanker niet meer behandeld worden met taxol of cisplatina. Deze geneesmiddelen hebben veel bijwerkingen, en werken maar tijdelijk doordat er resistentie optreedt. Daarom is het belangrijk om in te zien dat men meer moet focussen op een combinatie van verschillende targeted therapieën die welbepaalde pathways gaan inhiberen, gecombineerd met hormonale therapie. Hierdoor heeft men meer kans dat er veel tumorcellen vernietigd worden, zonder al te veel bijwerkingen. Verder onderzoek met meer patiënten is nodig om deze theorie te testen.

De meerwaarde aan deze masterproef is dat je een breed beeld krijgt over de functie van EMT en kanker in het algemeen. Verder wordt in deze thesis uitgebreid de verschillende kankereigenschappen besproken. Bijkomend is er goed overzicht gemaakt over de algemene en specifieke behandeling bij borstkanker. De beperkingen van de thesis is dat er misschien te weinig onderzocht is naar het voorkomen van EMT in borstkanker. EMT vindt men eigenlijk voornamelijk in lobulaire borstkanker door hun invasief karakter. Dit werd eigenlijk niet aangehaald.

CONCLUSIE: Epitheliale-mesenchymale transitie (EMT) heeft vermoedelijk een belangrijke rol in borstkanker. Dit proces zou mogelijks de oorzaak zijn van metastase bij verschillende carcinomen, waarbij ook borstkanker hoort. Echter zijn er nog bijkomende in vivo studies nodig om dit model als werkelijk te beschouwen. Doelgerichte behandelingen op pathway's van EMT geven een positief resultaat en doen ons inzien dat EMT een rol moet hebben in borstkanker.

6. Referentielijst

1. De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, et al. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochemistry and cell biology*. 2008;130(3):481-94.
2. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-8.
3. Kourtidis A, Lu R, Pence LJ, Anastasiadis PZ. A central role for cadherin signaling in cancer. *Experimental cell research*. 2017;358(1):78-85.
4. Lai YC, Cheng CC, Lai YS, Liu YH. Cytokeratin 18-associated Histone 3 Modulation in Hepatocellular Carcinoma: A Mini Review. *Cancer genomics & proteomics*. 2017;14(4):219-23.
5. Kumar A, Gupta T, Berzsenyi S, Giangrande A. N-cadherin negatively regulates collective *Drosophila* glial migration through actin cytoskeleton remodeling. *Journal of cell science*. 2015;128(5):900-12.
6. McCrea PD, Gottardi CJ. Beyond beta-catenin: prospects for a larger catenin network in the nucleus. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2016;17(1):55-64.
7. Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science (New York, NY)*. 2013;342(6159):1234850.
8. Gary C. Schoenwolf SBB, Philip R. Brauer, Philippa H. Francis-West, editor. *Larsen's Human Embryology*. fourth ed 2009.
9. Richard E. Jones KHL. *Human Reproductive Biology*. third ed: Academic press; 2006. 624 p.
10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
11. Luo M, Brooks M, Wicha MS. Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance. *Current pharmaceutical design*. 2015;21(10):1301-10.
12. Guttilla IK, Adams BD, White BA. ERalpha, microRNAs, and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2012;23(2):73-82.
13. Kucharz EJ, Kopec-Medrek M. Systemic sclerosis sine scleroderma. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*. 2017;26(5):875-80.
14. Piera-Velazquez S, Mendoza FA, Jimenez SA. Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. *J Clin Med*. 2016;5(4).
15. Soni S, Padwad YS. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncol*. 2017;56(4):503-15.
16. Breast anatomy, physiology & pathology 2017. Available from: <https://studentradiographer.com/?p=1021>.
17. Dhont M. *Handboek Gynaecologie*. second ed: Acco; 2012. 430 p.

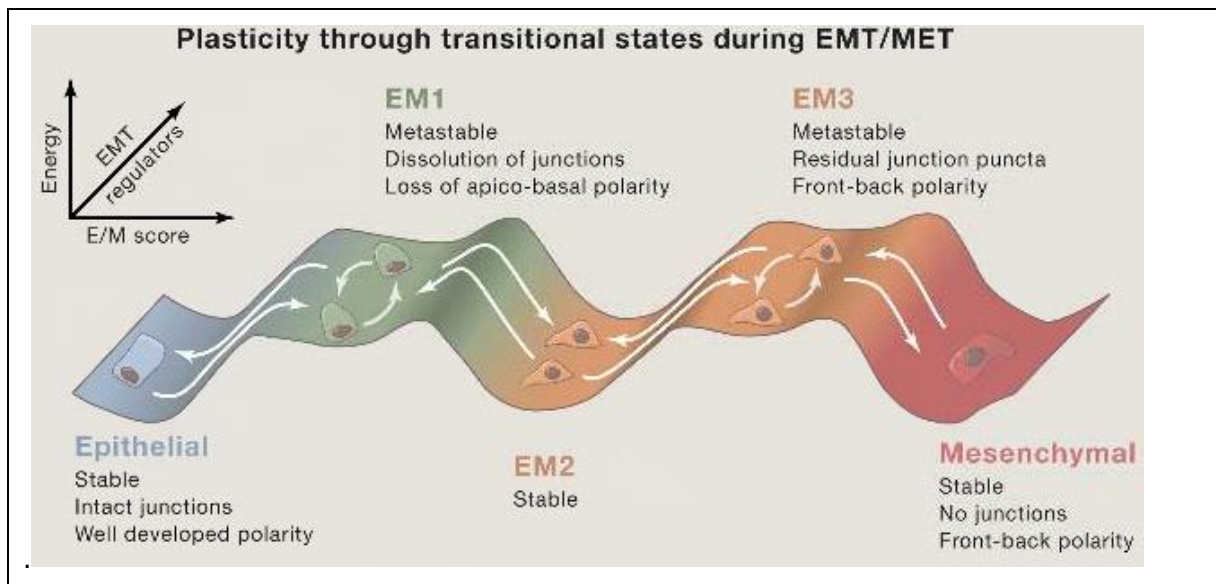
18. Registry BC. Cijfers over kanker 2014. Available from: <http://www.kankerregister.be/media/docs/SKRstats/2014/2014-F-BEL-Abs.pdf>.
19. gezondheid.be. Prognose (overlevingskansen na 5 jaar) 2016. Available from: http://www.gezondheid.be/index.cfm?art_id=3562&fuseaction=art.
20. Oncoline. mammacarcinoom 2017. Available from: http://www.oncoline.nl/richtlijn/bijlage.php?bijlage_id=2.
21. Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Julien S, Prevost G, Zimmer A, et al. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat*. 2008;11(4-5):123-51.
22. Lee JJ, Loh K, Yap YS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer biology & medicine*. 2015;12(4):342-54.
23. Kim S, Lee Y, Seo JE, Cho KH, Chung JH. Caveolin-1 increases basal and TGF-beta1-induced expression of type I procollagen through PI-3 kinase/Akt/mTOR pathway in human dermal fibroblasts. *Cell Signal*. 2008;20(7):1313-9.
24. Terry S, Yang X, Chen MW, Vacherot F, Buttyan R. Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer. *J Cell Biochem*. 2006;99(2):402-10.
25. Sabatino L, Pancione M, Votino C, Colangelo T, Lupo A, Novellino E, et al. Emerging role of the beta-catenin-PPARgamma axis in the pathogenesis of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7137-51.
26. Tavernier J. *Moleculaire biologie Deel 1*. Gent U, editor. Leuven: Acco; 2013. 240 p.
27. Paranjape T, Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut*. 2009;58(11):1546-54.
28. Roxanis I. Occurrence and significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Journal of clinical pathology*. 2013;66(6):517-21.
29. Yoshida T, Ozawa Y, Kimura T, Sato Y, Kuznetsov G, Xu S, et al. Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial-mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal-epithelial transition (MET) states. *British journal of cancer*. 2014;110(6):1497-505.
30. Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, Bartlett JM. EMT in Breast Carcinoma-A Review. *Journal of clinical medicine*. 2016;5(7).
31. Jin X, Mu P. Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer (Auckl)*. 2015;9(Suppl 1):23-34.
32. Pomp V, Leo C, Mauracher A, Korol D, Guo W, Varga Z. Differential expression of epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in intrinsic subtypes of breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2015;154(1):45-55.
33. Wei XL, Dou XW, Bai JW, Luo XR, Qiu SQ, Xi DD, et al. ERalpha inhibits epithelial-mesenchymal transition by suppressing Bmi1 in breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6(25):21704-17.
34. Song LB, Li J, Liao WT, Feng Y, Yu CP, Hu LJ, et al. The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(12):3626-36.

35. Brozovic A. The relationship between platinum drug resistance and epithelial-mesenchymal transition. *Arch Toxicol.* 2017;91(2):605-19.
36. Yang CH, Horwitz SB. Taxol(R): The First Microtubule Stabilizing Agent. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8).
37. Dubois EA, Rissmann R, Cohen AF. Denosumab. *British journal of clinical pharmacology.* 2011;71(6):804-6.
38. Nickel A, Stadler SC. Role of epigenetic mechanisms in epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine.* 2015;165(1):126-42.
39. Jandial R, Choy C, Levy DM, Chen MY, Ansari KI. Astrocyte-induced Reelin expression drives proliferation of Her2+ breast cancer metastases. *Clinical & experimental metastasis.* 2017;34(2):185-96.
40. Witzel I, Oliveira-Ferrer L, Pantel K, Muller V, Wikman H. Breast cancer brain metastases: biology and new clinical perspectives. *Breast cancer research : BCR.* 2016;18(1):8.
41. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166(1):21-45.
42. Zhang Q, Yu N, Lee C. Mysteries of TGF-beta Paradox in Benign and Malignant Cells. *Frontiers in oncology.* 2014;4:94.

7. Bijlage

7.1 Plasticiteit bij EMT

Kankercellen zijn onderhevig aan plasticiteit. Plasticiteit is de eigenschap om van één fysisch toestand over te schakelen in een ander toestand zoals voorgesteld bij het EMT proces. Epitheliale-mesenchymale transitie laat toe dat epitheelcellen omgevormd kunnen worden tot mesenchymcellen en omgekeerd. De flexibiliteit van fenotype omschakeling gebeurt echter veel complexer. Cellen oscilleren niet tussen een volledige epitheliale en volledige mesenchymale vorm, maar evolueren eerst naar een intermediaire toestand. De intermediaire toestand wordt ook gedeeltelijke EMT genoemd en speelt een rol in alle EMT klasse 's (41).



Figuur 24: EMT proces gebeurt in verschillende intermediaire toestanden (41).

Uit figuur 24 kan men vaststellen dat er zowel een metastabiele als een stabiele stadia zijn. Het metastabiele stadium bevat meer thermodynamische energie dan het stabiele stadium. Deze energie dient om van de ene toestand naar een volgende toestand over te gaan.

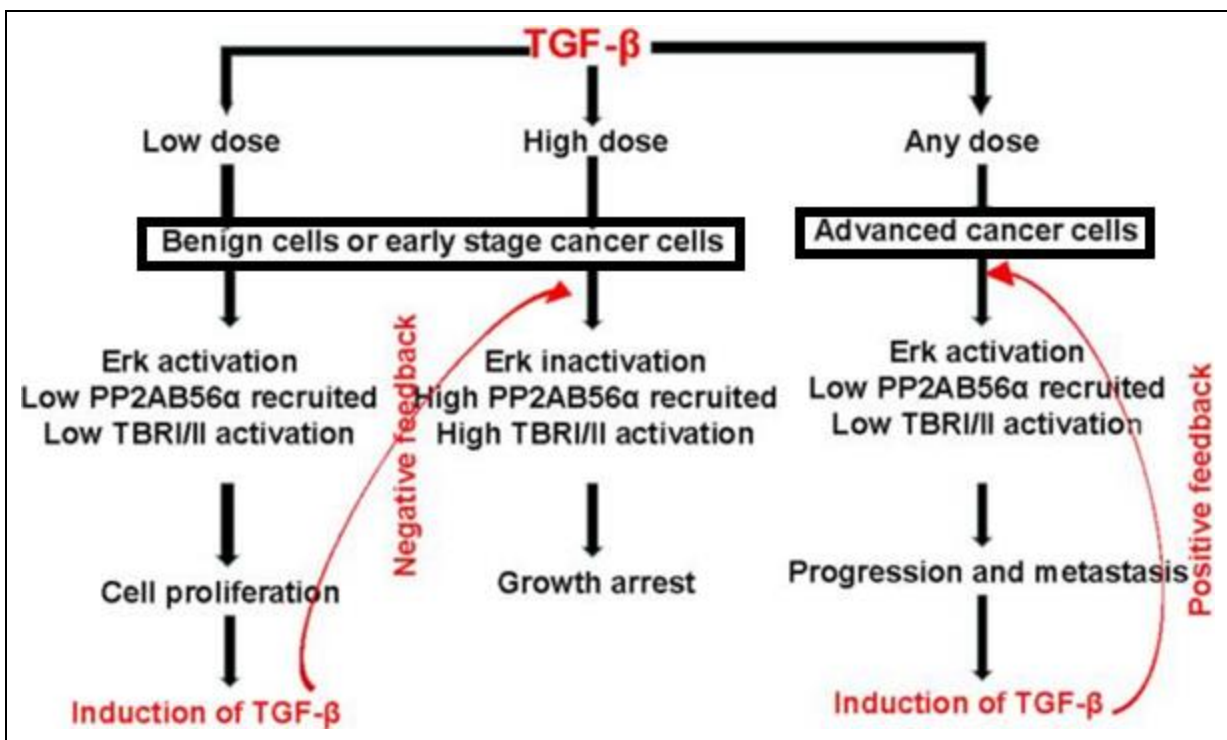
7.2 TGF- β paradox

Het TGF- β eiwit zorgt in de normale fysiologie voor controle van de celcyclus (celdeling en celgroei), maar zal bij kankercellen overgeschakeld worden tot een eiwit die aanleiding heeft tot groei en metastase. Hoe kan een eiwit twee tegengestelde functies hebben? In de recente literatuur zijn er modellen uitgeschreven die een antwoord kunnen bieden op het TGF- β paradox (42).

Het TGF- β eiwit kan het Erk eiwit activeren in kanker cellen. Daarentegen kan het TGF- β , Erk gaan inactiveren bij benigne cellen of vroeg stadium kanker cellen (42).

Wanneer goedaardige cellen of kankercellen die in een vroeg stadium zitten, blootgesteld zijn aan een lage activiteit van TGF- β zal dit Erk gaan activeren. Dit zal cel proliferatie en verhoogde expressie van TGF- β teweeg brengen. Deze verhoogde expressie van TGF- β zal aanleiding geven tot een negatieve feedback. Hoge TGF- β gaat Erk gaan inactiveren en hierdoor groeiarrest geven (42).

Kankercellen die in een vergevorderde toestand (metastase) bevinden gaan continu Erk gaan activeren ongeacht de dosis van TGF- β . Erk activatie leidt tot verhoogde expressie van TGF- β waardoor Erk nog meer geactiveerd wordt. Deze positieve feedback leidt tot aanhoudende groei en metastase (42).



Figuur 25: TGF- β paradox bij kanker (42).