

University of Groningen

Molecular mechanisms regulating epithelial-to-mesenchymal transition and therapy sensitivity in breast cancer and glioblastoma

Liang, Yuanke

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Liang, Y. (2019). Molecular mechanisms regulating epithelial-to-mesenchymal transition and therapy sensitivity in breast cancer and glioblastoma. [Groningen]: Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

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

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

CHAPTER 10

Nederlandse samenvatting
(Dutch summary)

Samenvatting

Borstkanker, de meest gediagnosticeerde kanker bij vrouwen, kent een toename in incidentie terwijl mortaliteit de laatste decennia afneemt, hetgeen voornamelijk kan worden toegeschreven aan vroege detectie en effectievere behandeling [1-3]. Intrinsieke of verworven resistentie voor geneesmiddelen is echter één van de belangrijke oorzaken voor het mislukken van de behandeling van borstkanker. Ongeveer 70-75% van de borstkankers zijn oestrogeenreceptor (ER) en / of progesteronreceptor (PR) -positief en 12-18% zijn triple-negatieve borstkankers (TNBC), zonder ER-, PR- en HER2-expressie [4]. Endocriene (hormoon) therapie gericht tegen deze receptoren vermindert het recidief-risico bij patiënten met hormoonreceptor-positieve borstkanker met gelokaliseerde ziekte, en levert bovendien klinisch voordeel op bij gemetastaseerde ziekte [5, 6]. Helaas worden deze receptor-positieve borstkankers veelvuldig resistent tijdens de behandeling, waardoor endocriene therapie niet meer werkzaam is. Door afwezigheid van effectieve doelgerichte therapie is chemotherapie de standaard behandeling voor patiënten met TNBC. Deze patiënten reageren doorgaans beter dan andere borstkankersubtypen op preoperatieve chemotherapie en leid veelvuldig tot een volledige respons (pCR). Echter, chemo-resistentie treed vaak op bij TNBC wat leidt tot terugkeer van de kanker [7].

Glioblastoma (GBM) is de meest voorkomende en dodelijke hersentumor en heeft nog altijd een zeer slechte prognose met een 5-jaarsoverleving van ongeveer 5% [8]. Standaardbehandeling is chirurgie gevolgd door chemo-radiotherapie, welke maar beperkt succes heeft vanwege de sterke infiltratieve groei van de tumor en een hoge mate van chemo-radiatie resistentie van de GBM-cellen. Helaas zijn er nog geen effectieve doelgerichte therapieën gevonden voor GBM, hetgeen wordt toegeschreven aan de hoge mate van cellulaire heterogeniteit in GBM [9]. Ook immunotherapie dat succesvol is in andere kankertypes, zijn dusver niet effectief bij GBM als gevolg van de immunosuppressieve ('koude') eigenschappen van deze tumor [10]. In GBM zijn stamcellen geïdentificeerd, genaamd GBM-stamcellen (GSC's), die bijdragen aan heterogeniteit door hun differentiatie mogelijkheden en worden verantwoordelijk gehouden voor therapieresistentie [9]. GSC's worden gereguleerd door signalen afkomstig van niches en / of de micro-omgeving van de tumor, waarbij GSC's met een mesenchymaal fenotype vooral resistent en agressief zijn.

Het bovenstaande illustreert dat een beter begrip van therapeutische resistentiemechanismen in zowel borstkanker als GBM nodig zijn om dit probleem te overwinnen door nieuwe verbeterde behandelingsstrategieën te ontwikkelen.

Onderzoek heeft aangetoond dat epitheliale-naar-mesenchymale transitie (EMT) één van

de centrale processen is welke leidt tot tumormetastasen [11, 12]. Er zijn verschillende signaalroutes geïdentificeerd die betrokken zijn bij de inductie van EMT, zoals de Notch-route, TGF β -SMAD-signalering, canonieke of niet-canonieke Wnt signalering, groeifactor-receptor tyrosine kinases en extra cellulaire matrix (ECM)-integrine routes [13-16]. Een interessant bijkomstigheid is dat deze stimuli ook zelfvernieuwing bij kankerstemcellen kunnen reguleren en er is een verband aangetoond tussen EMT en kankerstemcel-eigenschappen [17].

Het doel van het werk beschreven in dit proefschrift was het onderzoeken van de betrokkenheid van EMT en onderliggende regulatie mechanismen bij het agressieve gedrag van borstkanker en GBM zoals therapie-resistentie, groei, invasief gedrag/ mogelijkheid tot metastaseren en stamceleigenschappen.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding over borstkanker en GBM en de huidige therapeutische uitdagingen, het doel en de hoofdlijnen van dit proefschrift. ER-expressie en -functie zijn een voorwaarde voor de gevoeligheid van borstkanker voor hormoontherapie en EMT kan deze moduleren. In **hoofdstuk 2** hebben we een MCF-7-celmodel gekarakteriseerd dat resistent is voor tamoxifen. Deze MCF-7-Tam-R cellen bleken CD146/MCAM tot overexpressie te brengen vergeleken met tamoxifen gevoelige MCF-7 cellen. Verhoogde CD146 expressie correleerde significant met terugkeer van kanker na behandeling (relapse-free survival(RFS)) en de aanwezigheid van op afstand-gelegen metastasen (distant metastasis relapse-free survival (DMFS)) bij borstkankerpatiënten, vooral in de groep patiënten die alleen een behandeling met tamoxifen kregen. Vergeleken met MCF-7-cellen vertoonden MCF-7-Tam-R-cellen veranderingen in morfologische kenmerken en een verhoogde motiliteit en invasief gedrag, evenals verhoogde expressie van EMT-merkers. We hebben aangetoond dat CD146 tamoxifen-resistentie veroorzaakt, door ER α -expressie te verlagen en tegelijkertijd Slug expressie te verhogen hetgeen leidt tot EMT inductie en activatie van de AKT-overlevingsroute. In **hoofdstuk 3** hebben we een sterke correlatie gevonden tussen Notch3 en ER α in borstkankercellijnen en menselijke borstkankerweefsels met een lumaal epitheliaal fenotype. Interessant is dat ectopische overexpressie van Notch3 resulteerde in activering van ER α in ER α -negatieve borstkankercellijnen, terwijl omgekeerd het verlagen van Notch3 expressie door RNA interferentie in ER α -positieve cellen ER α -expressie verlaagde. Onderzoek naar het onderliggende regulerende mechanisme toonde aan dat het intracellulaire domein van Notch3 (N3ICD) specifiek bindt aan CSL (CBF-1, Su (H), Lag-1)-bindingselementen die aanwezig zijn in het ER α -promotorgebied en ER α -expressie activeren, en ook leidt tot remming van EMT, invasief gedrag *in vitro* en metastatische verspreiding *in vivo*. Verlagen van Notch3 expressie in NOTCH3-positieve borstkankercellen had het tegenovergestelde effect, namelijk de inductie van EMT en verlaagde ER α -niveaus. Verder bleek uit analyse van een grote klinische microarray-database dat verhoogde Notch3-transcriptniveaus significant geassocieerd zijn met een betere relapse-vrije overleving (RFS) bij

gediagnosticeerde borstkankerpatiënten, vooral bij patiënten met ER α -positieve tumoren. Deze resultaten suggereren een rol van de Notch3 / ER α -as bij het in stand houden van het lumbinale-subtype en remmen van tumorigenese en metastaseren van borstkanker.

Het onderliggende mechanisme van Notch3-afhankelijke regulatie van ER α werd vervolgens in meer detail onderzocht. In **hoofdstuk 4** vonden we dat Notch3 een doelwit was van twee onco-microRNA's, microRNA-221 en microRNA-222. MiR-221/222-expressie is omgekeerd gecorreleerd met Notch3- en ER α -expressies in de bestudeerde borstkankercellijnen. Ectopische expressie van miR-221/222 stimuleerde EMT, terwijl overexpressie van Notch3 remmer, N3ICD, de oncogene functie van miR-221/222 verlaagde. Na verder onderzoek bleek miR-221/222 te binden aan het 3'-niet-getranslateerde gebied van Notch3 mRNA en de translatie tot Notch3 eiwit te onderdrukken. In **hoofdstuk 5** hebben we aangetoond dat de transcriptiefactor GATA3, die essentieel is voor de ontwikkeling van de borstklier van de mens en differentiatie van borstkankercellen, een nieuw 'downstream' doelwit is van Notch3-signalering. Onderzoek naar het regulatiemechanisme van Notch3 en GATA-3 liet zien dat beide positief geassocieerd waren met ER α -expressie bij borstkanker. Interessant is dat ectopische N3ICD-expressie leidde tot verhoging van GATA-3 expressie in ER α -negatieve borstkankercellijnen, terwijl verlaging van Notch3-expressie resulteerde in verlaging van GATA-3-expressie in ER α -positieve cellen. Bovendien hebben we met behulp van een reporterassay en een chromatin-immune precipitation (ChIP)-assay aangetoond dat Notch3 kan binden aan CSL-DNA motieven in de GATA-3 promotor, wat suggereert dat N3ICD GATA-3-expressie direct activeert. *In vitro* en *in vivo* experimenten hebben verder aangetoond dat Notch3 gedeeltelijk EMT remt door transcriptie activatie van GATA-3, hetgeen leidt tot verlaging van metastatische verspreiding van borstkankercellen. De resultaten hierboven beschreven vergroten onze kennis over Notch3-signalering bij borstkanker. We hebben ontdekt dat miR-221/222 Notch3-expressie direct moduleren en dat Notch3 vervolgens GATA3- en ER α -niveaus reguleert die op hun beurt het EMT-proces en de metastase bij borstkanker sterk kan bepalen.

Intrinsieke of verworven resistentie tegen chemotherapie is nog altijd een van de belangrijkste redenen voor het falen van de behandeling van borstkankerpatiënten, met name bij TNBC. In **hoofdstuk 6** hebben we cisplatine-resistente TNBC-cellen gemaakt, MDA-MB-231-DDPR-cellen genoemd, en vonden dat de expressie van zowel Notch1 en CD146 significant hoger was in deze cellen dan in controle MDA-MB-231 cellen. *In vitro* experimenten toonden aan dat blootstelling aan een lage dosis cisplatine (niet-cytotoxisch) leidde tot een tijdsafhankelijke toename van Notch1 en CD146 expressie in TNBC-cellen. Bovendien was de expressie van de mesenchymale merker Vimentin en van klassieke chemoresistie-geassocieerde eiwitten, zoals pAKT, P-gp en MRP1, ook significant verhoogd in MDA-MB-231-DDPR-cellen. Vervolgens lieten verschillende experimenten, bestaande uit twee-voudige fluorescerende reporter assays, ChIP- en electrophorese-mobility-shift-assays (EMSA), zien dat Notch 1-ICD direct kan binden aan de CSL-bindingsplaatsen in CD146-promoter en ex-

pressie kan induceren in TNBC cellen. Remming van Notch1 leidde tot een significante daling van CD146 expressie, resulterend in reversie van EMT en cisplatine-resistentie in TNBC-cellen. Onze resultaten tonen aan dat doelgerichte modulatie van Notch1/CD146-as een mogelijke therapeutische benadering is om het therapeutisch effect van chemotherapie te verbeteren bij de behandeling van patiënten met TNBC.

In GBM zijn tumoragressiviteit en therapieresistentie gekoppeld aan een mesenchymaal subtype, of aan een verworven mesenchymaal fenotype. Zoals hierboven beschreven is CD146 een unieke EMT-inductor en modulator van tumoragressiviteit en therapeutische resistentie bij borstkanker. De mogelijke betrokkenheid en functie van CD146 bij GBM zijn echter nog grotendeels onbekend. In **hoofdstuk 7** hebben we aangetoond dat CD146 expressie verhoogd is in GBM in vergelijking met normaal hersenweefsel. Ook verschillen de expressieniveaus tussen neurosfeer GBM cellen afkomstig van patiënten. Bovendien heeft eerder onderzoek door anderen laten zien dat Gliomen van klasse III en IV hogere CD146-niveaus heeft vergeleken met graad I en II gliomen; hoge CD146-expressie correleerde ook met kortere ziektevrije overleving (disease-free survival, DSF) en algemene overleving (overall survival, OS) bij GBM-patiënten [18]. Dit suggereert dat CD146 een oncogene functie heeft bij GBM hetgeen we nader hebben onderzocht. Hiervoor hebben we een CRISPR / Cas9 CD146 knockout en een ectopic CD146 / GFP overexpressie-model gemaakt in twee verschillende GBM-neurospheres en vervolgens CD146 functie onderzocht. CD146 bleek pleiotrope effecten te hebben in GBM door zowel mesenchymale transitie (EMT), stam cell-potentie als radioresistentie te bevorderen. CD146 bleek ook p53-accumulatie en NF-KB-activering te onderdrukken welke leiden tot verhoging van cel-overleving en resistentie. Interessant is ook dat we een nieuwe functie voor CD146 hebben gevonden, namelijk als een activator van de transcriptiefactor YAP die celgroei en overleving reguleert, wat gedeeltelijk via het remmen van de Hippo-route lijkt te verlopen. Gezamenlijk tonen deze resultaten aan dat CD146 van belang is bij het maligne gedrag van GBM cellen en resistentie voor therapie. Dit suggereert dat doelgerichte inactivatie van CD146 signalering een nieuwe therapeutische benadering kan zijn voor deze dodelijke hersentumor.

