

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/32849> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Kocatürk, Begüm

Title: Tissue factor isoforms in cancer and blood coagulation

Issue Date: 2015-04-29

Nederlandse discussie en samenvatting

Achtergrond

Het stollingssysteem is een optimaal gereguleerd systeem dat uiteindelijk leidt tot de vorming van een fibrine-rijk stolsel. Dit stolsel dient als een stop om bloedverlies te voorkomen in beschadigde bloedvaten. De zogenaamde stollingscascade bestaat uit een serine protease systeem en vormt de basis voor de secundaire hemostase. In deze cascade leidt de activatie van een serine protease tot het knippen en activeren van een volgende protease, waarna deze protease in staat is een volgend protease te activeren. Deze cascade dient goed gereguleerd te worden aangezien hoge activatie van het stollingssysteem kan leiden tot trombose. Aan de andere kant kan een verminderde activatie van de stollingscascade leiden tot bloedingen.

De stollingscascade is onderverdeeld in twee verbonden 'paden'; de intrinsieke stolling en de extrinsieke stolling. Tissue factor (TF), in het Nederlands ook wel weefselfactor genoemd, is de activator van de extrinsieke route; wanneer TF in contact komt met bloed, bindt het een zymogeen –een inactief enzym-, factor VII. Dit leidt tot activatie van factor VII tot VIIa en het TF:VIIa complex bindt en knipt factor X tot het actieve enzym factor Xa. Op zijn beurt zet factor Xa protrombine om in trombine. Trombine activeert 1) de bloedplaatjes en 2) de intrinsieke route op het oppervlak van deze geactiveerde bloedplaatjes. De intrinsieke route leidt tot nog meer trombine vorming die uiteindelijk hoog genoeg is om het oplosbare fibrinogeen in het bloed om te zetten in fibrine draden. Hoewel de stollingsinitiatie door de extrinsieke route en de stollingsamplificatie door de intrinsieke route van even groot belang zijn voor efficiënte bloedstolling, wordt in dit proefschrift voornamelijk ingegaan op de moleculaire en cellulaire processen die verantwoordelijk zijn voor de regulatie van TF activiteit.

Naast activatie van de bloedstolling, is TF ook betrokken bij een aantal facetten van de celbiologie die ogenschijnlijk geen rol spelen in de stolling. Zo beïnvloedt TF wondgenezing, maar ook processen als ontsteking en kanker. TF gebonden aan factor VIIa blijkt deze processen te sturen door het activeren van een cellulaire receptor, PAR-2, een proces waarbij integrine-binding aan TF ook een grote rol speelt. Deze activatiestap is vooral goed gekarakteriseerd bij kankercellen en leidt tot bloedvat vorming in tumoren, tumorcelmigratie en invasie, en remming van celdood (apoptose).

Het overgrote gedeelte aan TF dat aanwezig is op het membraan van een cel bevindt zich in een inactieve conformatie; het heeft een lage affiniteit voor factor VIIa en is niet in staat factor X te binden. TF in deze staat wordt cryptisch TF genoemd. Het blootstellen van cellen die TF tot expressie brengen aan sterke oxidanten zoals kwikchloride, of substanties die leiden tot intracellulaire calciumfluxen, leidt tot een activatie stap van TF. Dit maakt

duidelijk dat er een regulatorisch mechanisme bestaat dat TF inactief houdt totdat het geactiveerd dient te worden. Een aantal modellen zijn ontwikkeld om deze TF activatiestap te verklaren. In het eerste model reguleren calciumfluxen de activiteit van flippases, floppases en scramblases, eiwitten die in staat zijn lipiden uit te wisselen tussen de binnen- en buitenkant van het celmembraan. Het netto effect is dat de buitenkant van het membraan wordt verrijkt met het negatief-geladen fosfatidylserine. Doordat dit lipide negatief geladen is, kan het membraan stollingsfactoren gaan binden en deze factoren binden vervolgens ook beter aan TF. In een ander model is TF activiteit afhankelijk van haar plaats in het membraan; de aanwezigheid van TF in zogenaamde 'lipid rafts' leidt tot TF activatie, terwijl het wegnemen van TF uit de lipid raft de activiteit vermindert. Het derde model stelt dat TF covalente bindingen met een ander TF molecuul aangaat om dimeren te vormen, en deze dimeren worden verondersteld inactief te zijn.

Als laatste wordt ingegaan op de 'disulfide theorie'. Het extracellulaire domein van TF bevat een tweetal disulfidebruggen; een disulfidebrug bevindt zich tussen de cysteïnes op posities C49 en C57, terwijl een tweede disulfidebrug zich bevindt tussen C186 en C209. Het eiwit 'Protein Disulfide Isomerase' is in staat de twee disulfidebruggen te verbreken (reduceren), waardoor een inactieve TF vorm ontstaat. Oxidatie door PDI (het creëren van de disulfidebrug tussen C186 en C209), leidt juist tot TF stollingsactiviteit. In het eerste gedeelte van dit proefschrift hebben wij onderzocht of dit laatste model TF activatie kan verklaren. Dit is van belang, aangezien een beter begrip van TF (in)activatie bijdraagt aan ons begrip van trombose.

Naast TF dat verankerd in het celmembraan zit, is er ook een oplosbare vorm van TF (alternatively spliced TF; asTF). Het normale TF mRNA bestaat uit 6 exonen, maar door alternatieve splicing wordt exon 5 verwijderd. Het directe gevolg hiervan is dat de aminozuurvolgorde van het carboxyterminale gedeelte verandert en dat het transmembrane gedeelte van TF afwezig is. Hoewel een aantal onderzoeksgroepen hebben laten zien dat asTF de stolling aan kan zetten, suggereren andere onderzoeksgroepen dat asTF geen stollingsfunctie heeft. Helaas is nog onduidelijk waar deze tweespalt in de literatuur op berust. Echter, asTF heeft wel bewezen functionaliteit in andere processen zoals bloedvatvorming. In het tweede gedeelte van dit proefschrift werd onderzocht welk effect asTF productie door tumorcellen heeft op het verloop van kanker en hoe asTF dit in gang zet. Ten slotte werd onderzocht hoe de invloeden van TF en asTF zich verhouden met betrekking tot kankerprogressie.

Regulatie van TF activiteit

TF is verankerd in het membraan en dit beperkt TF functie tot het oppervlak van de cellen die niet in contact staan met de bloedstroom (het subendotheel). Desondanks zijn er steeds meer aanwijzingen dat TF aanwezig kan zijn in het bloed op bloedcellen of als oplosbaar eiwit. Daarnaast kan TF gedurende ziekteprocessen zoals sepsis of kanker voorkomen op micropartikels (MPs) die afgesnoerd worden door subendotheliale cellen, en afgegeven worden aan de bloedbaan. Inderdaad blijken patiënten die leiden aan een aantal typen kanker vaak hoge concentraties aan TF-positieve MPs in hun bloed te hebben en dit is mogelijk de reden dat sommige kankerpatiënten een verhoogd risico hebben op trombose. Echter deze associatie tussen TF-positieve MPs en trombose komt in lang niet alle kankerpatiënten voor. Derhalve is het waarschijnlijk dat deze TF pool onderhevig is aan functie-regulatie, oftewel, TF bevindt zich in een cryptische staat. De gangbare modellen voor decryptie van TF en de consequenties daarvan voor de fysiologie en pathologie worden besproken in **hoofdstuk 2**.

Van alle decryptiemodellen is het disulfidemodel het meest omstreden; in een aantal wetenschappelijke publicaties door Kothari en collega's wordt data aangedragen waaruit moet blijken dat TF mutanten die de disulfide tussen C186 en C209 missen, evenveel stollingsactiviteit bevatten als TF moleculen die deze disulfide nog wel hebben. In deze mutanten zijn de cysteines op deze posities gemuteerd naar een alanine of een serine. Eerder werk heeft al laten zien dat deze mutaties, met name in het geval van de C186 positie, gepaard gaan met gedeeltelijke misvouwing en afbraak van het eiwit. Als gevolg hiervan is het moeilijk stollingsactiviteit van TF mutanten te vergelijken met die van ongemuteerd TF. Kothari heeft dit probleem opgelost door stollingsactiviteit uit te drukken als functie per molecule TF. Desalniettemin is het waarschijnlijk dat deze aanpak gepaard gaat met andere artefacten. Daarom hebben we in **hoofdstuk 3** een poging gedaan BHK cellijnen te maken die gelijke hoeveelheden ongemuteerd TF of gemuteerd TF tot expressie brengen. Zoals verwacht leidde mutatie van de cysteine op positie 186 tot verminderde expressie. Echter, mutatie op positie C209 of een dubbelmutatie op posities C186 en C209 leidde tot expressie die gelijk was aan die van het ongemuteerde TF. De TF mutanten vertoonden allen minder TF activiteit dan het ongemuteerde TF. In het geval van de C209 mutant werden ook TF dimeren waargenomen. Incubatie van cellen met een reagens dat direct aan vrije thiolen bindt, remde dimeer vorming en verminderde TF coagulante activiteit. Dit suggereert dat voornamelijk de TF dimeren coagulante activiteit bevatten. Het is goed, op te merken dat Kothari en collega's ook dimeren waarnamen in cellen die de C186-C209 dubbelmutant tot expressie brachten. Wellicht kan TF ook op andere, niet-covalente wijze, binding aangaan met een ander TF molecule. Dit impliceert

dat de TF activiteit zoals uitgedrukt in activiteit per molecuul TF, een incorrecte schatting is.

Alhoewel de disulfide theorie gestaafd wordt door *in vitro* benaderingen, is bewijs voor de rol van een disulfide in TF activiteit in muismodellen vooralsnog afwezig. Een interessante optie zou kunnen zijn om muizen te maken die mutant TF tot expressie brengen en de rol van de TF disulfide in zowel stolling als trombose te bepalen. Zoals eerder genoemd bevat het bloed van kankerpatiënten met trombose meer TF-positieve MPs dan het bloed van kankerpatiënten zonder trombose, en het meten van de redoxstatus van TF op deze MPs zou een indicatie kunnen geven voor het risico op trombose in deze patiënten.

Tissue factor isovormen en tumor progressie

Initiële studies suggereren dat alternatief gespliced TF (asTF) stollingsactiviteit heeft. Daaropvolgende studies laten echter het tegendeel zien. Daarom werden in ons laboratorium studies uitgevoerd naar andere functies van asTF in de biologie. Onze groep heeft eerder aangetoond dat asTF geen PARs activeert, maar signaaltransductie activeert door te binden aan integrines. Dezelfde studie laat ook zien dat asTF bloedvatvorming bevordert door integrines te activeren. Omdat bloedvatvorming een belangrijke voorwaarde is voor tumorgroei, speelt asTF mogelijk ook een rol in tumorgroei. Gepubliceerde studies hebben al laten zien dat subcutane implantatie van MiaPaCa pancreaskankercellen die normaal gespliced TF (ook wel full length TF; flTF) of asTF tot expressie brachten, alleen leidde tot grote tumoren met een uitgebreid bloedvat netwerk, wanneer deze cellen asTF tot expressie brachten. Helaas werd het mechanisme achter de stimulerende invloed van asTF op tumorgroei niet bepaald. Tevens bleef het onduidelijk of deze resultaten van toepassing zijn op tumorontwikkeling in mensen.

In **hoofdstuk 5** hebben we geprobeerd beter inzicht te krijgen in de rol van asTF in borstkanker. Als eerste werd gekeken naar de invloed van asTF op borstkanker met behulp van patiëntmateriaal. Een 'tissue microarray' met tumorspecimens van 574 patiënten werd onderworpen aan een histochemische analyse waarbij gekeken werd naar expressie van flTF en asTF in tumorcellen. De mate van asTF en flTF expressie was positief geassocieerd met hogere tumorgraad. Echter, alleen asTF expressie kon worden geassocieerd met hogere T status. Om deze nader te onderzoeken werden MCF-7 borstkankercellen die asTF of flTF tot expressie brachten geïmplantieerd in de melkklieren van muizen. Deze methode is nader beschreven in **hoofdstuk 8**. De resultaten van dit experiment waren in overeenstemming met die van Hobbs en collega's; asTF expressie leidt tot snellere tumorgroei, meer bloedvaten in de tumor en vermeerderde infiltratie van de tumor door macrofagen, dan flTF expressie door de tumor. In celmodellen werd

vervolgens aangetoond dat asTF expressie leidt tot expressie van regulatoren van de celcyclus (cycline A1), verminderde expressie van celcyclus inhibitoren (p27^{kip} en p21^{waf}), en celproliferatie. Men moet zich echter realiseren dat MiaPaCa en MCF-7 cellen geen expressie vertonen van PAR-2, de receptor voor het flTF:factor VIIa complex. Dit zou derhalve kunnen verklaren waarom tumorcellen die flTF tot expressie brengen, niet leiden tot grote tumoren. Alhoewel dit is tegenstrijdig met onze resultaten die laten zien dat een flTF antilichaam dat PAR-2 activatie remt (10H10) ook de celproliferatie van flTF-positieve MCF-7 cellen remt, vermoeden wij dat 10H10 ook de interactie tussen flTF en integrines remt. Desalniettemin lijkt de invloed van flTF en PAR-2 *in vivo* groter te zijn dan de invloed van TF/integrine complexen *in vitro*.

Een mogelijke tekortkoming in ons model is dat tumorcellen flTF en asTF normaliter tegelijkertijd tot expressie brengen. Om deze tekortkoming te omzeilen werd vervolgens gebruik gemaakt van een zeer agressieve borsttumor cellijn (MDA-MB-231mfp) die alletwee de TF isovormen endogeen tot expressie brengt. In overeenstemming met ons MCF-7 model, blijkt asTF ook in deze cellen te leiden tot celproliferatie. Remming van asTF door antilichamen in muismodellen leidde tot kleinere tumoren en histochemische analyse toonde aan dat het aantal prolifererende tumorcellen lager was na asTF remming, terwijl de vorming van bloedvaten in de tumor onaangedaan was.

Eerder werk heeft reeds laten zien dat asTF ook een functie heeft in bloedvatvorming. Het is op dit moment nog steeds onduidelijk of, in muismodellen, asTF bloedvat vorming induceert doordat tumoren die asTF tot expressie brengen harder groeien, of doordat asTF-afhankelijke bloedvat vorming leidt tot meer prolifererende tumorcellen. In eerdere studies werd recombinant asTF gebruikt om te onderzoeken wat de rol van asTF is in bloedvat vorming. Een beter aanpak is wellicht om te bepalen of asTF secretie van angiogene factoren stimuleert in tumorcellen en deze secreten te testen in modellen die bloedvatvorming nabootsen.

Alternatief gespliced Tissue Factor en integrines

Voorheen is aangetoond dat integrines de activatie van PAR-2 door het TF:factor VIIa complex bevorderen, door te complexeren met TF. asTF-afhankelijke signaal transductie is PAR-2-onafhankelijk en binding van asTF aan $\alpha v\beta 3$ bevordert celmigratie via activatie van p38 MAP kinase en PI3-kinase. Binding van asTF aan $\alpha 6\beta 1$ bevordert capillair vorming via p42/p44 MAP kinase en PI-3 kinase. De muis homologe van asTF (masTF) induceert identieke effecten, maar capillairvorming door masTF is afhankelijk van een andere integrine subset; zowel $\beta 1$ als $\beta 3$ integrine-binding zijn noodzakelijk. In **hoofdstuk 4** worden de interacties tussen asTF en integrine subsets in een review besproken.

Omdat asTF effecten op bloedvatvorming in eerder werk afhankelijk bleken te zijn van integrine activatie, onderzochten wij of de effecten van asTF op borsttumor groei ook afhankelijk waren van integrines. We toonden aan dat effecten van asTF op celproliferatie afhankelijk zijn van $\beta 1$ integrine activatie in MCF-7 cellen, terwijl $\beta 3$ integrines geen rol speelden in dit proces. MCF-7 cellen brengen geen $\alpha\beta 3$ integrines tot expressie en daarom werden effecten van asTF op celproliferatie ook getest in andere celmodellen. Identieke bevindingen werden gedaan in MDA-MB-231mfp cellen die beide integrine subsets tot expressie brengen. We maakten gebruik van immunofluorescentie microscopie om aan te tonen dat asTF niet alleen bindt aan $\beta 1$ integrines, maar $\beta 1$ integrines ook activeert. Met behulp van een antilichaam dat bindt aan een specifiek domein van $\beta 1$ integrines (de zogenaamde β -tail domain, β TD), en een peptide dat homologie heeft met dit domein, konden we aantonen dat asTF bindt aan dit β -tail domain. Dit domein is gelegen in de membraan-proximale regio en is betrokken bij integrine substraat binding. De β TD is verbonden met het β A domein via de zogenaamde CD loop. De interactie tussen β TD en β A houdt de integrine dimeer in een 'gebogen' inactieve conformatie. Zodra integrines binden aan hun substraat verandert de conformatie van de CD loop zodat de β TD en de β A domeinen gescheiden worden en de integrine actief wordt. asTF-afhankelijke celproliferatie werd geremd door het antilichaam tegen het β TD domein en het peptide. Tevens was proliferatie afhankelijk van extracellulair asTF, en niet intracellulair asTF. Daarom veronderstellen wij dat asTF binding aan het β TD integrines in hun actieve conformatie brengt. Integrines kunnen daarom beter binden aan de extracellulaire matrix en het is reeds aangetoond dat dit de celcyclus bevordert door verhoogde expressie van cyclines en verminderde expressie van p21waf en p27kip.

Als vervolgstap is het wellicht interessant te onderzoeken hoe $\beta 1$ integrine/asTF interactie leidt tot tumorgroei in muizen door $\beta 1$ uit te schakelen in tumorcellen. Een probleem hierbij is dat meerdere tumorprocessen afhankelijk zijn van $\beta 1$ integrines en deze experimenten zouden niet veel informatie geven over de specifieke rol van asTF in tumorgroei. Het maken en tot expressie laten komen van asTF mutanten die niet meer binden aan integrines is waarschijnlijk een betere benadering om te rol van asTF in tumorgroei *in vivo* op te lossen.

Tissue Factor isovormen stimuleren borstkankergroei op verschillende manieren

De literatuur en onze eigen data geven aan dat asTF en fITF een verschillend effect hebben op borstkankerprogressie. De fITF/PAR-2 as beïnvloedt voornamelijk de bloedvatvorming in de tumor via fosforylatie van het intracellulaire gedeelte van fITF, terwijl wij in **hoofdstuk 5** beschreven dat asTF borsttumorgroei met name beïnvloedt door een

proliferatief programma aan te zetten. Op basis hiervan vermoedden wij dat een combinatie van fITF en asTF expressie leidt tot een optimale tumorgroei. In **hoofdstuk 5** gebruikten we MCF-7 cellen die elk van deze isovormen apart tot expressie brachten, en geen PAR-2 expressie vertonen. Deze karakteristieken maakten het moeilijk om een uitspraak te doen over de precieze bijdragen van fITF en asTF aan tumorprogressie. Om deze bijdragen beter te karakteriseren, maakten we gebruik van MDA-MB-231mfp cellen die fITF, asTF en PAR-2 tot expressie brengen. In **hoofdstuk 6** wordt beschreven dat deze cellen in de melkklier van immuun-deficiënte muizen werden ingespoten in de aanwezigheid van fITF- of asTF-remmende antilichamen, of een combinatie van deze antilichamen.

Remming met behulp van de afzonderlijke antilichamen leidde in beide gevallen tot een vermindering van tumorgroei. De gecombineerde remming leidde tot een nog hogere vermindering van tumorgroei; de combinatie van antilichamen remde significant beter dan fITF remming alleen, terwijl een trend ($p=0.12$) tot betere remming werd gezien ten opzichte van alleen asTF remming. Deze data laten zien dat beide isovormen bijdragen aan kankerprogressie, maar via verschillende mechanismen en signaaltransductiepaden. Echter, het is goed mogelijk dat fITF en asTF ook leiden tot de activatie van gezamenlijke paden, aangezien het verschil in tumorgroei tussen de asTF remming en de antilichaamcombinatie niet significant was. Individuele remming van fITF of asTF had ook een effect op metastase, maar de combinatie van antilichamen remde metastase niet beter dan de afzonderlijke antilichamen.

Voor de remming van fITF werd gebruik gemaakt van een antilichaam dat fITF-afhankelijke PAR-2 activatie remt, maar niet de stollingsactivatie. Eerdere publicaties lieten zien dat dit antilichaam niet in staat is metastase te remmen, en dit is in scherp contrast met onze eigen bevindingen. Hier moet gezegd worden dat de modellen om metastase te bepalen zoals beschreven in de literatuur en zoals beschreven in ons eigen werk, verschillen in opzet. In eerder werk werd gebruik gemaakt van een experimenteel metastase model waarbij tumorcellen direct in de bloedomloop werden ingespoten, terwijl wij metastase bepaalden na het inspuiten van tumorcellen in de melkklier. In ons model, zoals beschreven in **hoofdstuk 8**, wordt het gehele metastatische proces, inclusief invasie en lokalisatie van cellen naar de bloedbaan nagebootst, terwijl in het experimentele metastase model cellen direct in de staartvene worden ingebracht. Het is dus goed mogelijk dat ons fITF-blokkerende antilichaam de vroege fases van metastase en niet de late fases van metastase remt.

Alternatief gespliced Tissue Factor en de synergie met oestrogeen in borstkanker

In eerder werk gebruikten we borstkanker cellijnen die positief zijn voor de oestrogeen receptor (MCF-7) en negatief zijn voor deze receptor (MDA-MB-231mfp), om asTF-specifieke effecten op tumorgroei aan te tonen. In deze context is het van belang dat patiënten met tumoren die positief of negatief zijn voor deze receptor een andere behandeling vereisen.

Met dit in gedachten ontwierpen we in **hoofdstuk 7** een studie om te onderzoeken of TF isovormen interacties aangaan met oestrogeen receptoren. Gebruik werd gemaakt van dezelfde tissue array beschreven in **hoofdstuk 5**. Patiëntmateriaal werd verdeeld in groepen op basis van oestrogeen receptor positiviteit of negativiteit en associaties tussen TF isovorm expressie en klinische parameters werden wederom bepaald in deze groepen. Een associatie werd waargenomen tussen asTF expressie enerzijds en hogere graad/T status anderzijds in de oestrogeen receptor-positieve groep, maar niet in de negatieve groep. De genprofielen in **hoofdstuk 5**, zoals bepaald met genarrays, werden opnieuw geanalyseerd; overeenkomsten tussen asTF-afhankelijke genexpressie en genexpressie door andere stimuli werden bepaald met behulp van 'Ingenuity Pathway Analysis'. We ontdekten dat zowel flTF- als asTF-afhankelijke genexpressie sterke overeenkomsten vertoonden met de genprofielen na stimulatie met oestrogeen. Meer specifiek bleken vooral genen betrokken bij proliferatie en migratie opgereguleerd te zijn. Met behulp van proliferatie-experimenten kon worden aangetoond dat flTF of asTF-positieve borsttumorcellen (maar niet de controle cellen) sneller prolifereren als ze worden gestimuleerd met oestrogeen. De asTF-positieve MCF-7 cellen leken het gevoeligst voor oestrogeen stimulatie, en dit effect was wederom afhankelijk van asTF/integrine interactie. Hoewel asTF-afhankelijke proliferatie eerder werd waargenomen in de afwezigheid van oestrogeen in **hoofdstuk 5**, moet vermeld worden dat ons medium voorheen fenol rood bevatte, hetwelk een zwakke activator van de oestrogeen receptor is. Daarom werden onze vervolgentoetsen in **hoofdstuk 7** uitgevoerd in medium zonder fenol rood. Vervolgens werden de effecten van oestrogeen op asTF-positieve MCF-7 cellen bestudeerd in muismodellen. Terwijl implanteren van asTF-positieve cellen in muizen constitutief al leidde tot snellere tumorgroei dan het implanteren van controle cellen, leidde het toedienen van oestrogeen via een geïmplanteerde pellet, tot een nog snellere tumorgroei. Oestrogeen pellets hadden weinig tot geen effect op tumorgroei na implantatie van asTF-negatieve MCF-7 cellen. Zowel asTF cellen als controle cellen migreerden sneller *in vitro* na toevoeging van oestrogeen. Derhalve concludeerden wij dat tumorcel proliferatie, maar niet migratie, afhankelijk is van interacties tussen asTF/integrine signalering en de oestrogeen receptor.

Hoewel wij niet in staat waren directe verbanden tussen asTF-afhankelijke signaaltransductie componenten en oestrogeen receptor-afhankelijke componenten te identificeren, denken wij dat asTF-afhankelijke genen een rol spelen in oestrogeen receptor signaaltransductie of *vice versa*. Een alternatieve mogelijkheid is dat de input van beide signaaltransductie routes synergistisch werkt op proliferatie. In toekomstige experimenten is het van belang te bepalen of het remmen van de oestrogeen receptor ook effecten van asTF op proliferatie remt.

Conclusie

In dit proefschrift zijn een aantal onduidelijkheden met betrekking tot de rol van TF isovormen in stolling en kanker weggenomen. Studieopzetten waarin de rol van deze isovormen in kanker met elkaar werden vergeleken kunnen leiden tot de ontwikkeling van nieuwe therapeutische benaderingen in borstkanker. We hebben ook een nieuwe vorm van synergie tussen oestrogeen receptor signalering en asTF signalering ontdekt die onze kijk op de hormonale component van borstkanker veranderen.

