



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Tissue factor isoforms and cancer

Berg, Y.W. van den

Citation

Berg, Y. W. van den. (2013, October 8). *Tissue factor isoforms and cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/21936>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/21936>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21936> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Berg, Yascha Wilfred van den
Title: Tissue factor isoforms and cancer
Issue Date: 2013-10-08

Nederlandse discussie en samenvatting

Achtergrond

Tijdens de evolutie heeft zich in de afgelopen 450 miljoen jaar vanuit een op serine-proteases gebaseerd, aangeboren afweersysteem in niet-gewervelde dieren, een complex bloedstollingsysteem ontwikkeld dat de vasculaire integriteit verzorgt in gewervelde dieren. Onder normale omstandigheden wordt bloed vloeibaar gehouden om te dienen als een transportmedium voor zuurstof, voedingsstoffen, hormonen, cellen en afbraakproducten van het metabolisme. Na beschadiging van de vaatwand echter, moet overmatig bloedverlies worden voorkomen door vorming van een bloedstolsel. Als eerste vindt vasoconstrictie plaats waardoor de locale toevoer van bloed wordt verminderd; daarnaast aggregeren bloedplaatjes om een voorlopige barrière te vormen. Tegelijkertijd initieert de interactie tussen celmembranen gebonden, full-length tissue factor (fITF) en andere eiwitten van het bloedstollingsysteem de vorming van een fibrine netwerk dat de bloedplaatjesplug stabiliseert.

Onder bepaalde omstandigheden, zoals bij immobilisatie of kanker, kan bloedstolling plaatsvinden wanneer dit niet gewenst is, wat uiteindelijk uitmondt in trombose. Recentelijk is het duidelijk geworden dat het stollingsysteem, en in het bijzonder expressie van fITF op tumorcellen, invloed heeft op de progressie van kanker zowel direct als indirect via de activering van protease activated receptors (PARs).

In 2003 is een vorm van tissue factor (asTF) ontdekt die ontstaat na alternatieve splicing van het pre-mRNA; de biologische betekenis van asTF is nog niet geheel duidelijk en is daarom nog volop onderwerp van onderzoek. Een rol van asTF in fysiologische bloedstolling zoals boven beschreven voor fITF, is nog niet ontdekt. AsTF komt tot expressie in verschillende menselijke tumorweefsels en in een alveolaire kankermodel is aangetoond dat expressie van asTF in tumoren leidt tot grotere, meer gevasculariseerde tumoren. Een groot deel van dit proefschrift beschrijft de eigenschappen van asTF voor zover ze niet de bloedstolling aangaan en vergelijkt deze met die van fITF, overwegend in de context van kanker, maar ook in die van atherosclerose.

Een ander deel van het proefschrift richt zich op fITF en zijn ligand factor (F)VII (a). Wij hebben ontdekt dat de ectopische expressie van factor VII in tumorweefsels van borstkankerpatiënten is geassocieerd met een slechte prognose bij relatief jonge patiënten. Voorts beschrijven we een in silico studie naar de evolutionaire conservering van een allosterische disulfide in fITF. De conformatie van deze disulfide fungeert als een post-translationeel mechanisme dat fITF-activiteit controleert en is derhalve relevant voor (patho)fysiologische processen waarbij fITF betrokken is.

Alternatively spliced tissue factor en angiogenese

Bij alternatieve splicing van het TF pre-mRNA wordt exon 5 overgeslagen waardoor een verschuiving van het open reading frame optreedt. Deze frame shift leidt tot een vervanging van de transmembrane -en cytoplasmatische domeinen door een nieuw C-terminaal domein van 40 aminozuren met een compleet andere, unieke sequentie. AsTF is daarmee bovendien een niet membraan gebonden, oplosbaar eiwit geworden.

Sinds de ontdekking van asTF, is er veel discussie in het vakgebied over de rol van asTF bij gezondheid en ziekte. Of asTF zich gedraagt als een procoagulant eiwit hangt sterk af van de experimentele condities, maar de meeste onderzoeken vonden tot op heden geen rol voor asTF in de bloedstolling. In die onderzoeken waar een mogelijke rol voor asTF in de bloedstolling werd gevonden, was asTF veel minder krachtig dan fITF.

De bevinding dat expressie van asTF, meer dan die van fITF, leidt tot grotere, meer gevasculariseerde tumoren in een alveeslierkankermodel, was voor ons de aanleiding om de functies van asTF nader te karakteriseren. In **hoofdstuk 2** beschrijven we hoe asTF angiogenese bevordert. We ontdekten dat asTF specifiek $\alpha 6\beta 1$ en $\alpha v\beta 3$ integrines op endotheelcellen kan ligeren. Ligatie van deze integrines door asTF leidt tot migratie en capillairvorming van endotheelcellen en uiteindelijk tot angiogenese *ex vivo* en *in vivo*. Blokkade van stollingseiwitten zoals factor VII (FVII) en trombine, of knock-out van PAR2 hadden geen invloed op deze effecten wat aantoont dat asTF zijn effecten op een andere manier bewerkstelligt dan fITF. Interessant is dat in onze *in vivo* en *ex vivo* angiogenese assays, de angiogene werking van asTF vergelijkbaar was met die van vascular endothelial growth factor (VEGF), terwijl het extracellulaire domein van fITF -zogenoemd soluble TF (sTF)- geen angiogene respons veroorzaakte. Alhoewel het uitblijven van sTF-geïnduceerde angiogenese nogal onverwacht lijkt, is het in overeenstemming met het eerder beschreven alveeslierkankermodel waarin fITF ook geen tumorgroei bevorderde. Tot op heden hebben we geen plausibele verklaring voor deze bevinding, maar een relatieve afwezigheid van PAR2 en FVII als twee *conditiones sine qua non* voor fITF-geïnduceerde tumorgroei, kan dit contra-intuïtieve resultaat gedeeltelijk verklaren.

In het door ons voorgestelde model van asTF-geïnduceerde tumor angiogenese, wordt asTF uitgescheiden door tumorcellen en diffundeert vervolgens in de tumor micro-omgeving om te dienen als ligand voor integrines op endotheelcellen. Ter ondersteuning van dit model hebben we getracht (patho)fysiologisch relevante concentraties van asTF in tumor weefsel te schatten. Daartoe hebben we asTF zowel op mRNA-niveau als op eiwitniveau in baarmoederhalskanker gekwantificeerd en daarbij hebben we eiwitpiegels tot 75 nM gevonden in extracten van tumormonsters, concentraties die in hetzelfde

bereik liggen van 1-100 nM asTF die angiogenese in *ex vivo* experimenten induceren. Echter, de tumorextracten werden verkregen van hele tumorlysaten en dit laat de vraag of tumorcellen asTF daadwerkelijk uitscheiden onbeantwoord. Het is bekend is dat asTF intracellulair kan worden vastgehouden door getransfecteerde cellen, maar in gestimuleerde endotheelcellen cellen kan het worden uitgescheiden in kweekmedia; daarom zijn vervolgonderzoeken nodig om het cellulaire transport van asTF in tumorcellen en afgifte van asTF in het tumormilieu te onderzoeken. Dan kan worden onderbouwd of tumoren inderdaad asTF uitscheiden om op een paracrine wijze angiogenese te stimuleren. Een andere experimentele benadering is het gebruik van exogeen asTF te vermijden en te kiezen voor een experimenteel ontwerp dat is gebaseerd op endogene asTF-productie. Hierbij zou gebruik kunnen worden gemaakt van RNA-interference dan wel een knock-in model in een tumormodel. Een dergelijke benadering geeft meer zekerheid dat daadwerkelijk door tumorcellen geproduceerd asTF angiogenese -en uiteindelijk tumorprogressie- stimuleert. In deze experimentele opzet kan de relatieve bijdrage van beide TF-isovormen worden onderzocht.

Alternatively spliced tissue factor en monocyten-endotheel interacties

We hebben ook onderzocht of asTF-geïnduceerde ligatie van integrines een rol speelt in andere processen waarbij angiogenese van belang is, zoals bijvoorbeeld in atherosclerose. Aangezien instabiele atherosclerotische plaques worden gekenmerkt door neovascularisatie, is het interessant om te onderzoeken of asTF bijdraagt tot angiogenese in atherosclerotische plaques en derhalve kan dienen als een diagnostische parameter of zelfs een aangrijpingspunt voor therapie. In **hoofdstuk 3** speculeren we over een dergelijke rol voor asTF. Aangezien monocyten/macrofagen asTF kunnen produceren én een dominante rol spelen in atherosclerose, bepleiten we dat asTF expressie in deze cellen atherosclerose kan beïnvloeden. Influx van monocyten en de uitrijping naar plaque-macrofagen is één van de belangrijkste kenmerken van atherosclerose, maar in toenemende mate wordt ook het belang van macrofagen in tumorgroei duidelijk; angiogenese-modulerende M2-macrofagen zijn hiervoor exemplarisch.

Hoofdstuk 4 is een verslag van hoe de interactie tussen endotheel en monocyten wordt beïnvloedt door de aanwezigheid van TF-isovormen. Ligatie van $\beta 1$ integrines op endotheelcellen door zowel recombinant asTF als sTF veroorzaakt een toename van expressie van adhesiemoleculen, zoals ICAM-1, VCAM-1 en E-selectine. Deze veranderingen in de expressie van adhesiemoleculen resulteert uiteindelijk in een verhoogde monocyten-endotheel interactie, zowel onder orbitale als laminaire flow. AsTF induceert een grotere toename van expressie van adhesiemoleculen in vergelijking met

sTF. Verder stimuleert asTF monocyt-endotheliale transmigratie in aanwezigheid van MCP-1. Deze experimenten geven aan dat de wisselwerking tussen TF-isovormen - vooral asTF - en integrines, monocyt adhesie aan en migratie door het endotheel bevordert, wat resulteert in een influx van monocyt in atherosclerotische plaques en tumoren.

Zoals het geval is voor de in **hoofdstuk 2** beschreven experimenten, is een nadeel van onze experimentele aanpak dat recombinant asTF of sTF van exogene origine is; een model waarin de rol van endogeen geproduceerde TF-isovormen wordt onderzocht representeert mogelijk beter de werkelijkheid. Zowel endotheelcellen als monocyt kunnen TF-isovormen tot expressie brengen, maar of het asTF dat de monocyt-endotheel interactie en monocyt instroom bevordert nu afkomstig is van het endotheel dan wel de monocyt, kan niet uit deze studie geconcludeerd worden.

Een alternatieve benadering om dit probleem aan te pakken is het genereren van weefsel-specifieke knock-out modellen voor zowel myeloïde cellen als endotheel. Dat zou de mogelijkheid geven om conditionele knock-out muizen te fokken met afwezigheid van een de TF-isovormen in monocyt dan wel endotheel. Een volgende stap zou zijn om dergelijke knock-out muizen te kruisen met een atherogeen muismodel waardoor beter inzicht kan worden verkregen in de volgorde van de gebeurtenissen in asTF-gemedieerde endotheel-monocyt interactie. Deze aanpak biedt de mogelijkheid om atherosclerose tijdens haar progressie te onderzoeken en dan met name of lokale ontstekingsreacties in vervette endotheelcellen asTF secretie induceren, of dat een atherogene toestand met systemische ontsteking monocyt aanzet tot productie van asTF. Maar zelfs dan blijft het mogelijk dat andere celtypen fungeren als een bron van TF-isovormen, bijvoorbeeld neutrofielen; het is echter nog onduidelijk of neutrofielen inderdaad in staat zijn om TF-isovormen tot expressie te brengen.

Afgezien van een experimentele benadering, kan het ook interessant zijn om een meer observationele studie uit te voeren en de expressie van asTF te onderzoeken in menselijke atherosclerotische monsters en associaties met klinische karakteristieken te inventariseren. Een mogelijk nadeel van een dergelijk onderzoek is dat de rol van TF-isovormen minder belangrijk zou kunnen zijn in gevorderde atherosclerose. Parallel aan deze opzet, zouden toekomstige studies over de rol van TF-isovormen in kanker - zoals voorgesteld in de paragraaf over angiogenese - nuttig kunnen blijken om het belang van asTF of fITF-gemedieerde macrofageninflux in tumoren te begrijpen.

Alternatively spliced tissue factor: van muizen en mensen

Muriene ziektemodellen worden steeds belangrijker voor het onderzoek naar de pathofysiologie en behandeling van menselijke ziekten. Hoewel recombinant humaan asTF actief is in muizen in *ex vivo* en *in vivo* angiogenese modellen -zoals besproken in **hoofdstuk 2**- bestaat er een algemene voorkeur voor syngene modellen. In muizen is een structurele homolog van humaan asTF beschreven, maar het was onduidelijk of murien asTF (masTF) dezelfde functionele eigenschappen heeft als humaan asTF (hasTF).

In **hoofdstuk 5** beschrijven we dat masTF tot expressie wordt gebracht in spontane, muriene borst- en alveolairkliertumormodellen en bovendien is masTF aanwezig in plaques van atherogene LDLR^{-/-} muizen. We tonen aan dat masTF endotheelcel-adhesie en -migratie bevordert en *ex vivo* angiogenese induceert in een met hasTF vergelijkbare mate. Bovendien leidt stimulatie van muriene endotheelcellen met asTF tot expressie van een panel van inflammatie- en adhesiemoleculen, die uiteindelijk zorgen voor een toegenomen adhesie van monocytten aan endotheelcellen, ongeacht of asTF van muriene of humane origine is.

Onze experimenten bevestigen (1) dat masTF met hasTF vergelijkbare eigenschappen bezit, en (2) dat onderzoek naar de rol van masTF in muriene ziektemodellen belangrijke informatie over de rol van hasTF in ziektes bij mensen kan verschaffen, en (3) dat asTF een rol speelt in kanker en atherogenese, niet alleen door ligatie van integrines op endotheelcellen, maar ook door het stimuleren van de influx van mononucleaire cellen.

Een aantal verschillen tussen humaan en murien asTF blijft echter nog onvoldoende begrepen. Hoewel hasTF-geïnduceerde endotheelcel adhesie wordt gemedieerd door ligatie van zowel $\beta 1$ en $\beta 3$ integrines, is masTF-geïnduceerde adhesie van muriene endotheelcellen alleen afhankelijk $\beta 3$ integrines. Daarentegen is masTF-geïnduceerde *ex vivo* angiogenese afhankelijk van zowel $\beta 1$ als $\beta 3$ integrines. Het is mogelijk dat de gebruikte muriene endotheliale cellijnen een overvloed aan $\beta 3$ integrines ten opzichte van $\beta 1$ integrines bezitten, maar dit hebben we niet getest. Ten aanzien van de *ex vivo* angiogenese assay, kan het mogelijk zijn dat de liganden voor $\beta 1$ zijn oververtegenwoordigd in matrigel, terwijl liganden voor $\beta 3$ integrines relatief schaars zijn, hetgeen we eveneens niet hebben onderzocht. Bovendien kan het benodigde integrinerepertoire tijdens angiogenese soortspecifiek zijn en misschien is activatie van $\beta 3$ integrines tijdens angiogenese belangrijker in muizen. Tenslotte is de nieuwe C-terminus van masTF langer dan die van hasTF en structurele overeenkomsten tussen beiden zijn nagenoeg afwezig. De functie van zowel de menselijke als de muriene C-terminus is niet

duidelijk, voor zover er al een functie is. Mogelijk leidt de langere C-terminus in muizen tot een andere confirmatie van masTF en dientengevolge tot een ander profiel aangaande ligatie van integrines.

Tissue factor isovormen hebben verschillende eigenschappen in kanker

Zoals duidelijk is geworden in het bovenstaande, is er voldoende bewijs dat asTF de progressie van ziekten waarbij angiogenese een rol speelt - zoals atherosclerose en kanker - kan beïnvloeden. Om te onderzoeken hoe de expressie van flTF en asTF zich verhoudt tot een aantal klinische karakteristieken van kankerpatiënten, hebben we een cohort van meer dan 500 borstkankerpatiënten onderzocht, van wie primair tumormateriaal is gekleurd voor asTF en flTF. De resultaten hiervan staan in **hoofdstuk 6**.

Beide TF-isovormen komen tot expressie in meer dan 95% van de onderzochte tumormonsters. Normaal weefsel (naast de tumorceleilanden) heeft een beperkte expressie van asTF en flTF, respectievelijk 4% en 38% van de controle monsters. Een hoog percentage asTF-positieve tumorcellen is geassocieerd met hogere graad en toegenomen tumorgrootte (weergegeven in de zogenaamde T-status), terwijl een toename van flTF-positieve tumorcellen geassocieerd is met hogere graad, maar niet met tumorgrootte. Interessant genoeg hebben asTF- en flTF-expressie geen invloed op de recidief-vrije, noch de relatieve overleving van borstkankerpatiënten. Aanvullende analyses in **hoofdstuk 7** laten echter zien dat bij vrouwen jonger dan 55 jaar expressie van flTF is geassocieerd met een kortere recidief-vrije en algehele overleving. Deze bevinding is in tegenstelling met andere studies waar TF-expressie in bijvoorbeeld long- of borstkanker is geassocieerd met een kortere overleving (**hoofdstuk 9**).

De weefselmonsters van het gebruikte cohort zijn betrekkelijk oud en dateren uit een periode waarin tumoren mogelijk in een verder gevorderd stadium werden gediagnosticeerd dan tegenwoordig. Een andere verklaring voor de afwezigheid van een associatie tussen de overleving en TF-isovorm expressie, is dat pre-klinische studies juist een rol vinden voor TF-isovormen in het begin van tumor-angiogenese en tumoren in een dergelijk beginstadium zijn nog niet detecteerbaar bij de mens.

In **hoofdstuk 6** beschrijven we ook een peri-nucleaire asTF-aankleuring in borstkankermonsters, hetgeen bevestigd is met confocale microscopie en door Western blotting na subcellulaire fractionering. De aard van deze perinucleaire lokalisatie van asTF is onduidelijk. De peri-nucleaire ruimte is een integraal onderdeel van het endoplasmatisch reticulum en indien veel asTF wordt geproduceerd, zou dat kunnen ophopen in het geval cellulaire secretie van asTF belemmerd is. Onze hypothese echter is

dat asTF intracellulaire eigenschappen heeft die het gedrag van tumorcellen kunnen beïnvloeden.

Wat de expressie van fITF in tumormonsters betreft, vonden we een opvallende associatie met aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1), een gevestigde tumorstamcelmarker in borstkanker. Tumorstamcellen hebben het vermogen om na injectie van een enkele cel uit te groeien tot een volledige tumor. Bovendien kunnen tumorstamcellen transdifferentiëren naar andere celtypes, zoals endotheelcellen, tijdens tumorangiogenese. Hoewel het een intrigerende hypothese is dat fITF:FVII:PAR2-signalering rechtstreeks stamcelfuncties induceert in tumorcellen, is het misschien een reëlere aanname dat fITF:FVII:PAR2-signalering slechts een van de vele eigenschappen van tumorstamcellen is.

Zoals al eerder voorgesteld, zullen experimenten met *in vivo* tumorcelmodellen die geprepareerd zijn om ofwel asTF ofwel fITF tot expressie te brengen door middel van knock-in of RNAi-gemedieerde knock-out, het inzicht verhogen in wat de relatieve bijdrage van elke TF-isovorm is. In deze experimenten moet de nadruk liggen op vroege tumorgroei met daarbij aandacht voor tumorangiogenese en influx van monocytten. Daarnaast zou onderzoek naar de rol van de fITF: FVII: PAR2-as in de tumorstamcel biologie interessant kunnen zijn.

Regulering van TF pre-mRNA splicing in kanker

Alternatieve pre-mRNA splicing kan een enkel gen laten functioneren als een bron voor verschillende mRNAs, wat uiteindelijk resulteert in de productie van verschillende eiwit-isovormen. Meer dan 95% van de genen produceren splicingsvarianten en sommige van deze alternatief gesplicete isovormen hebben antagonistische eigenschappen ten opzichte van de canonieke isovorm. Splicing wordt strak gereguleerd door *cis*-werkende factoren, namelijk eigenschappen van de nucleotidesequentie per se, en *trans*-werkende factoren, namelijk eiwit-RNA-complexen die het spliceosome vormen. De wisselwerking tussen *cis*- en *trans*-werkende factoren bepaalt de uiteindelijke mRNA-sequentie en dus uiteindelijk het evenwicht tussen de verschillende eiwit-isovormen. Alternatieve splicing krijgt momenteel aandacht binnen de oncologie en onderzoeksresultaten ondersteunen het idee dat karakterisering van splicingvarianten waardevol kan zijn voor prognostische en diagnostische doeleinden en eventueel voor de behandeling van kanker zelf.

Splicing kan kankerprogressie beïnvloeden door veranderde productie en functie van oncogenen en tumorsuppressorgen, of van genen die meer transcriptionele activiteit

genereren in tumoren tijdens processen zoals epitheliale naar mesenchymale transitie (EMT) en angiogenese. Verdere aanwijzingen voor het belang van splicing in maligniteiten komt uit data van hematologische maligniteiten waar genen die coderen voor het spliceosome zelf ook kunnen zijn gemuteerd. Dit resulteert in een afwijkende splicingmachinerie in kankercellen, wat uiteindelijk leidt tot verhoogde hoeveelheden alternatief gesplijcete mRNA's.

Mogelijke aangrijpingspunten voor behandeling kan een blokkade op ofwel RNA- of eiwitniveau van de afzonderlijke splicevarianten zijn, maar de hypothese is ook geopperd dat gezonde splicing zou kunnen worden hersteld in kankercellen en daarmee de productie van canonië tot expressie gebrachte eiwitten.

Verhoogde fITF-expressie is een algemeen kenmerk van kanker en verleent aan tumorcellen mitogene eigenschappen, leidt tot toegenomen celmigratie, terwijl ook angiogene factoren worden geproduceerd (**hoofdstuk 9**). AsTF heeft angiogene eigenschappen en expressie van asTF in bepaalde solide tumoren is net zoals fITF, geassocieerd met een ongunstige fenotype. Hoe de veranderingen met betrekking tot splicing in tumorcellen invloed hebben tot de relatieve expressie van asTF of fITF is nog onduidelijk.

De *cis*- en *trans*-regulerende elementen die de splicing van pre-mRNA TF controleren, zijn gekarakteriseerd in perifere bloedmonocyten, monocyten cellijnen en humane navelstreng endotheelcellen (**hoofdstuk 3**). SF2/ASF, SRp55 en SRp75 zijn *trans*-regulerende eiwitten die de inclusie van exon 5 bevorderen terwijl SC35 en SRp40 juist tot uitsluiting van exon 5 leiden. Op dit moment zijn de mRNA niveaus van deze splicingsfactoren bestudeerd in enkele vormen van kanker en hoewel in sommige tumoren de mRNA niveaus lager zijn voor eiwitten die inclusie van exon 5 bevorderen en hoger voor degenen die leiden tot uitsluiting, is de verhouding in andere tumoren juist andersom. Concluderend is onze kennis over hoe de expressie van TF-isovormen in kanker wordt gereguleerd nog te ontoereikend om te begrijpen hoe veranderingen in de splicingmachinerie van tumorcellen de expressie van fITF of asTF beïnvloeden, zijn studies in verschillende tumortypes nodig.

Full-length tissue factor en ectopische expressie van FVII

In **hoofdstuk 9** beschrijven we hoe het TF-gen transcriptioneel actief wordt in tumorcellen en vervolgens resulteert in een verhoogde fITF-expressie op de celmembraan van tumorcellen via goed gekarakteriseerde signaalroutes waaronder EGFR-sigtaaltransductie, hypoxie en EMT. De verhoogde expressie van fITF leidt tot meer fITF:FVII:PAR2-sigalering

op tumorcellen, wat direct resulteert in de productie van pro-angiogene factoren die op paracrine wijze invloed kunnen uitoefenen op het tumormilieu en het pro-mitogene en pro-migratoire fenotype van de tumorcellen zelf versterken. Verhoogde fITF-expressie leidt tot activatie van bloedstolling en de vervolgens geproduceerde stollingseiwitten faciliteren samen met bloedplaatjes metastasering van tumorcellen via de bloedstroom. Expressie van fITF is verhoogd in de meeste solide tumoren en is geassocieerd met ongunstige pathologische en klinische parameters; dit onderschrijft de biologische relevantie van fITF in tumorbiologie.

fITF is een belangrijke modulator van de progressie van kanker, maar het is onduidelijk hoe fITF:FVII:PAR2-signalering of activatie van bloedstolling kan plaatsvinden in tumoren die geen bloedvaten hebben om uit de lever afkomstig FVII te verkrijgen. Ectopische productie van FVII en een gelijktijdige toegenomen expressie van fITF en PARs is gedetecteerd in verscheidene tumorcellijnen en er wordt geopperd dat ectopische FVII expressie onderdeel is van een algemeen mechanisme dat tumorangiogenese bevordert. Om de klinische relevantie van ectopische FVII expressie te onderzoeken, gebruikten we hetzelfde cohort zoals bestudeerd in **hoofdstuk 6**, maar nu hebben we immunohistochemische kleuringen voor FVII uitgevoerd (**hoofdstuk 7**). Ectopische productie van factor VII is aanwezig in 39.3% van de tumoren in ons cohort, terwijl er geen FVII wordt gevonden in aangrenzend normaal borstklierweefsel. Na 10 jaar follow-up, was 72% van de patiënten met FVII-negatieve tumoren recidievrij tegenover 60% met FVII positieve tumoren ($P = .02$). Aangezien fITF dient als receptor voor FVII, hebben we ook de overleving bepaald bij patiënten met fITF:FVII dubbel positieve tumoren en dit vergeleken met een enkel positieve of negatieve tumoren en hierbij werd een nog groter verschil gevonden ($P = .006$). Bij patiënten jonger dan 55 jaar was dit effect meer uitgesproken, met een recidief-vrije overleving van 58% in fITF: FVII positieve tumoren in vergelijking met 82% voor enkel positieve of negatieve tumoren; het effect van fITF:FVII op recidief-vrije overleving was echter afwezig bij patiënten van 55 jaar en ouder. Bovendien kwamen in fITF:FVII positieve tumoren vaker Her2, oestrogeen- en progesteronreceptoren niet meer tot expressie. Deze zogenaamde triple negatieve tumoren staan bekend om hun agressieve fenotype en slechte prognose. Indien 65 jaar als cut-off werd gebruikt vonden we nog steeds vergelijkbare associaties met overleving. Op dit moment hebben we geen biologische verklaring voor deze leeftijd-afhankelijke associatie. Een aantrekkelijke hypothese is dat FVII expressie in tumoren een pre-menopauzaal, hormonaal gereguleerd fenomeen is, maar, omdat we een soortgelijke associatie vonden met een cut-off leeftijd van 55 jaar én 65 jaar, is deze hypothese onwaarschijnlijk. Toekomstige studies in andere solide tumoren, bijvoorbeeld coloncarcinoom, kan meer informatie geven of het een

borstkanker- of gender-specifiek fenomeen betreft of dat FVII-expressie toch een algemeen kenmerk is in solide tumoren.

Full-length tissue factor: evolutionaire conservering van cysteïnes

De meeste fITF-moleculen bevinden zich op de celmembraan in een inactieve, "cryptische" vorm en zij geven slechts hun volledige stollingsactiviteit prijs na een proces dat we decryptie noemen. Cryptisch fITF is in staat om FVIIa te binden en PAR2 te activeren. Cellulaire stimuli kunnen leiden tot snelle decryptie van fITF, maar het mechanisme hierachter blijft een kwestie van wetenschappelijk debat. Een mogelijk mechanisme is blootstelling van fosfatidylserine aan het celoppervlak, terwijl ook een rol voor proteïne disulfide isomerase (PDI)-afhankelijke disulfide vorming en afbraak tussen de cysteïnes op posities 186 en 209 is gesuggereerd. **Hoofdstuk 8** is een *in silico* analyse waarin we aantonen dat het extracellulaire domein van fITF, inclusief de regio rond de Cys186 en Cys209, is geconserveerd in vertebraten. Verdere vergelijking met andere bekende allosterische disulfidebinding-bevattende eiwitten leidde tot de identificatie van een homologe aminozuursequentie bestaande uit een proline, een serine of threonine, een arginine, gevolgd door een asparagine (PSR-N). De PSR-N-sequentie heeft een polaire en hydrofiele aard en uit verder onderzoek van kristalstructuren van eiwitten met een allosterische disulfide bleek dat de regio PSR-N zodanig gepositioneerd is dat deze bereikbaar is voor andere stoffen. De exacte rol van de PSR-N sequentie is onduidelijk, maar een aantrekkelijke hypothese is dat oxidoreductasen aan deze sequentie kunnen binden om de Cys186-Cys209 disulfidebinding confirmatie te kunnen veranderen. In toekomstig onderzoek kan worden onderzocht op welke manier de PSR-N regio de redoxstatus van fITF in de tumor micro-omgeving beïnvloedt.

Conclusie

Dit proefschrift beschrijft de tot nu toe onbekende non-hemostatische eigenschappen van aTF en vergroot onze kennis van de manier waarop TF-isovormen met integrines interacties aangaan in ziekteprocessen zoals kanker en atherosclerose. Verder worden associaties beschreven tussen expressie van TF-isovormen, factor VII en de klinische karakteristieken van kankerpatiënten. Hierbij worden nieuwe mogelijkheden geboden voor toekomstig onderzoek naar de niet-hemostatische effecten van het stollingsstelsel in kanker.