



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Exploring Grainyhead-like 2 target genes in breast cancer

Wang, Z.

Citation

Wang, Z. (2020, October 6). *Exploring Grainyhead-like 2 target genes in breast cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137309>

Version: 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/1887/137309>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137309> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Wang, Z.

Title: Exploring Grainyhead-like 2 target genes in breast cancer

Issue date: 2020-10-06

Samenvatting

Van de transcriptiefactor Grainyhead like 2 (GRHL2) wordt gerapporteerd dat het in sommige gevallen de groei van kanker bevordert en in andere studies aspecten van de progressie van kanker onderdrukt. In **Hoofdstuk 2** hebben we de rol ervan onderzocht in luminale en basale A subtypes van borstkanker. Bij borstkankerpatiënten verschilde de associatie van GRHL2-expressie met prognose voor verschillende subtypen en in een groot cellijnpaneel was GRHL2 laag of afwezig in basaal B- en aanwezig in alle luminale en basale A-cellijnen. In een luminale cellijn (MCF7) veroorzaakte het verlies van GRHL2 een blokkering van de celcyclus, verlies van kolonievormingscapaciteit en downregulatie van PCNA en hTERT. Tegelijkertijd ging E-cadherine verloren, maar er werd slechts een kleine toename in door EGF gestimuleerde motiliteit waargenomen. In een basale A-cellijn (HCC1806) onderdrukte de verwijdering van GRHL2 ook proliferatie en kolonievorming, maar er werden geen veranderingen gezien in PCNA en hTERT. Verlies van E-cadherine ging in dit geval gepaard met inductie van vimentine en N-cadherine en conversie naar een sterk migrerend fenotype, verder versterkt door EGF-behandeling. Deze resultaten wijzen op verschillende reacties op verlies van GRHL2 in luminale en basaalachtige borstkankers met betrekking tot groeiachterstand motiliteit, en suggereren dat GRHL2 een kandidaat-doelwit kan zijn bij luminale borstkanker.

GRHL2 ChIP-seq werd uitgevoerd in drie luminaalachtige en drie basale A-borstkankercellijnen van de mens om gemeenschappelijke en subtype-specifieke genomische bindingsplaatsen van GRHL2 bij borstkanker te identificeren (**Hoofdstuk 3**). De meeste bindingsplaatsen van GRHL2 werden gevonden in intergene en intronregio's. 13.351 gemeenschappelijke bindingsplaatsen werden geïdentificeerd in basale A-cellen, waaronder 551 bindingsplaatsen in gen promotor gebieden. Voor luminaalachtige cellen werden 6.527 gemeenschappelijke bindingsplaatsen geïdentificeerd, waarvan 208 bindingsplaatsen werden gevonden in genpromotorgebieden. Basale A- en luminaalachtige borstkankercellen deelden 4711 GRHL2-bindingsplaatsen, waarvan 171 bindingsplaatsen werden gevonden in genpromotorgebieden. De geïdentificeerde GRHL2-bindende motieven zijn allemaal identiek aan een motief dat is gerapporteerd voor menselijke eierstokkanker, wat wijst

op geconserveerde GRHL2-DNA-binding tussen menselijke kankercellen. Er zijn met opmerkelijk genoeg geen bindingsplaatsen van GRHL2 gedetecteerd in de promotorregio's van verschillende bekende EMT-gerelateerde genen, waaronder CDH1-, ZEB1-, ZEB2- en CDH2-genen. Gezamenlijk biedt deze studie een uitgebreid overzicht van interacties van GRHL2 met DNA en legt het de basis voor verder begrip van gemeenschappelijke en subtype specifieke signaalroutes gereguleerd door GRHL2 bij borstkanker.

Hoofdstuk 4 toonde aan dat dynamische veranderingen optreden in de aanmaak van nieuw RNA na verlies van GRHL2 in luminale borst door Bru-seq. De respons op GRHL2-verlies in luminale borstkankercellen werd bestudeerd door een MCF7- conditioneel knock-outmodel te combineren met Bru-seq-analyse. De snelheid van RNA-synthese van 264- en 244-genen werd respectievelijk voor ten minste één van de vier tijdstippen opwaarts of neerwaarts gereguleerd na verlies van GRHL2, variërend van 1-16 dagen. Er werden vijf dynamische responspatronen gekarakteriseerd en GRHL2-gecontroleerde canonieke signaleringsroutes en netwerken werden geïdentificeerd. Gezamenlijk karakteriseert dit hoofdstuk patronen van RNA-synthese gereguleerd door GRHL2 en identificeert het signaleringsroutes gereguleerd door GRHL2.

In **Hoofdstuk 5** werd ChIP-seq-analyse van GRHL2-bindende genen in MCF7-cellen geïntegreerd met Bru-seq-analyse van genen die transcriptionele reacties op conditionele CRIPR-Cas9-knock-out van GRHL2 in MCF7-cellen laten zien. Dit identificeerde 48 directe doelwitgenen van GRHL2 in MCF7-cellen. Signaleringsroutes en netwerken geassocieerd met deze directe GRHL2-doelgenen werden onderzocht met behulp van IPA software. Met name, in overeenstemming met ons vorige rapport dat de CDH1-promotor GRHL2-bindingsplaatsen mist, werd de RNA-synthese van CDH1, die codeert voor de epitheliale adhesie-receptor E-cadherine, niet veranderd na GRHL2-deletie, wat aantoont dat CDH1 geen direct doelgen van GRHL2 is. In plaats daarvan werd de epitheliale transcriptiefactor, EHF/ ESE3, een transcriptiefactor die, zoals GRHL2, EMT onderdrukt, geïdentificeerd als een direct doelgen van GRHL2. EHF was op alle tijdstippen neerwaarts gereguleerd na verwijdering van GRHL2 en,

net als GRHL2, was EHF specifiek afwezig bij basale B-achtige borstkanker in een pan-subtype menselijk borstkankercelijnpaneel. EHF is betrokken bij tumor-initiërende eigenschappen. De overexpressie ervan slaagde er echter niet in de proliferatie van borstkankercellen waarin GRHL2 was uitgeschakeld te redden. Gezamenlijk identificeert deze studie directe doelgenen van GRHL2 en hun gerelateerde signaalroutes en werpt licht op de epitheliale factoren GRHL2 en EHF in luminale-achtige borstkanker MCF7-cellen.