



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

**Interplay between cancer and thrombosis; identification of key factors**  
Ünlü, B.

**Citation**

Ünlü, B. (2019, January 29). *Interplay between cancer and thrombosis; identification of key factors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/68470>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/68470>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

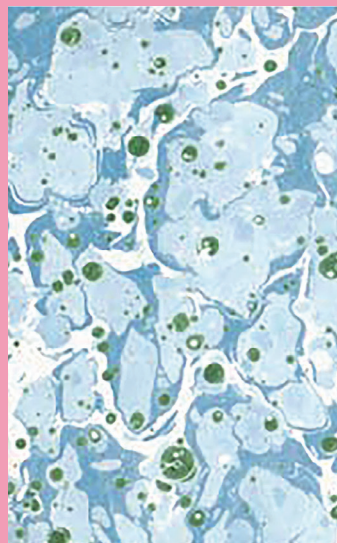


The handle <http://hdl.handle.net/1887/68470> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Ünlü, B.

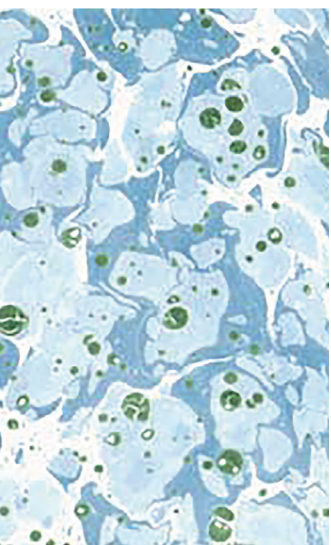
**Title:** Interplay between cancer and thrombosis; identification of key factors

**Issue Date:** 2019-01-29



# Chapter 9

Nederlandse discussie en samenvatting



## ACHTERGROND

Het menselijk lichaam is een complex systeem en reguleert verschillende processen, van het synthetiseren van kleine moleculen tot de werking van complete organen. Het vasculaire systeem zorgt ervoor dat het bloed door het lichaam kan circuleren, het levert voedingsstoffen, zuurstof en immuuncellen af aan weefsels en het voert afbraakproducten uit de cellen af. De hemostase zorgt voor de balans van het vasculaire systeem. Het bloed moet vloeibaar blijven in de afwezigheid van schade aan bloedvaten, en stollen na beschadiging van bloedvaten. Na een verwonding, wordt de primaire hemostase gestart, waarin bloedplaatjes geactiveerd worden en gaan samen klonten om het gat in het bloedvat af te dekken. Vervolgens, wordt de secundaire hemostase, ofwel de bloedstollingscascade, geïnitieerd door cellulair transmembraan eiwit genaamd weefselfactor (Tissue Factor; TF). Volgens de huidige cellulaire modellen, activeert TF dat tot expressie komt in het subendotheel de extrinsieke bloedstolling nadat het in contact komt met het bloed. Daar bindt en activeert het zijn natuurlijke ligand factor VII (FVII) om vervolgens actief factor X (FXa) te genereren, wat op zijn beurt lage concentraties trombine genereert. Via feedback-loops, ook wel bekend als de intrinsieke bloedstolling, zorgen deze trombine niveaus voor activatie van de stollingsfactoren IX, XI, V, VIII en X op de oppervlakte van geactiveerde bloedplaatjes. Doordat het een relatief langzaam proces is, draagt dit bij aan een stabilisatie van het stolsel. Deficiënties in componenten van deze signaleringscascade resulteren in verhoogd risico op bloedingen. Tenslotte, genereert FX in complex met FV dergelijk hoge concentraties trombine die voldoende zijn om oplosbaar fibrinogeen om te zetten in fibrine. Dit fibrine-rijke bloedstolsel stabiliseert de eerder door bloedplaatjes gevormde stolsel. In geval van ziekte is het evenwicht tussen bloedstollingsfactoren verstoord. Dit kan vervolgens lijden tot overmatige bloedingen, bijvoorbeeld in het geval van stollingsdeficiëntie zoals hemofilie, of tot veneuze trombose (VT) in het geval van een hypercoagulante staat.

In 2003 is er een tweede isovorm van TF ontdekt. Als gevolg van een frameshift door alternatieve splicing mist dit eiwit, asTF, het transmembraan domein, en heeft het een unieke C-terminale staart. Daardoor is asTF, in tegenstelling tot membraangebonden TF, een oplosbaar eiwit. Het is aangetoond dat asTF angiogenese stimuleert door te binden aan integrine  $\alpha v \beta 3$ , hetgeen migratie van endotheelcellen te bevordert. Daarnaast bindt het aan  $\alpha 6 \beta 1$  integrine om capillairen te vormen. In ziekteprocessen zoals kanker zorgt asTF voor versnelde tumorgroei door te binden aan  $\beta 1$  integrines. In borstkanker vertoont asTF signaal transductie een synergisme met de oestrogeen receptor (ER) signaleringsroute om verdere groei van borstkanker te versnellen. Interessant is dat in alvleeskliertumoren, asTF de stollingsactiviteit van cellen en daarvan afgesnoerde blaasjes (microvesicles; MVs) verhoogt,

maar of asTF daadwerkelijk stollingseigenschappen heeft staat nog ter discussie. Ondanks dat het N-terminale gedeelte van asTF identiek is aan normaal gespliced TF (full-length TF; flTF) en het een bindingsplaats heeft voor FVII, mist asTF een bindingsplaats voor FIX en FX. Desondanks is expressie van asTF gevonden in pathologische bloedstolsels. Daarom is het eerste gedeelte van dit proefschrift gewijd aan het bepalen of asTF daadwerkelijk stollingseigenschappen heeft, en of er een samenspel is tussen asTF en flTF in de initiatie van de stolling op endotheelcellen.

Vaak wordt er in kankerpatiënten een verhoogde pro-coagulante staat waargenomen en deze patiënten hebben een verhoogd risico op kanker-geassocieerde trombose (cancer-associated thrombosis; CAT). CAT is de tweede meest voorkomende doodsoorzaak bij kankerpatiënten, na de gevolgen van kanker zelf. Helaas is de diagnose van CAT in deze patiënten ook geassocieerd met een slechtere prognose en verhoogde sterftkans, iets dat simpelweg niet verklaard kan worden door de gevolgen van VT zelf. Deze verkleinde kans op overleven zou beïnvloed kunnen worden door verhoogde activatie van cellulaire en circulerende stollingsfactoren, factoren die ook een rol spelen bij trombose. Activatie van deze stollingsfactoren leidt vervolgens tot activatie van bepaalde transmembraan eiwitten, zogenaamde Protease-activated Receptors (PARs), die mogelijk een rol spelen bij kankerprogressie. Normaliter worden stollingsfactoren gemaakt in de lever, maar stollingseiwitten geproduceerd door tumorcellen zijn ook in staat tumorgroei, angiogenese en metastase te beïnvloeden. Het tweede gedeelte van dit proefschrift behandelt daarom de effecten van stollingsfactoren op tumorprogressie. Er gaat vooral aandacht uit naar de rol van TF-afhankelijke signaaltransductie in borstkanker metastase. Dit is relevant aangezien TF vaak gezien wordt als de onmiskenbare link tussen kanker en stolling. In het laatste gedeelte van dit proefschrift worden genetische en niet-genetische factoren besproken die uiteindelijk kunnen leiden tot CAT. We beschrijven een nieuw muismodel om de effecten van tumor ontwikkeling op trombus formatie te bestuderen. Ten slotte, laten wij in een 'unbiased approach' zien welke (nieuwe) moleculaire mechanismen en biologische signaleringsroutes betrokken zijn bij CAT in een 'proof-of-principle' studie.

## **1. Alternatief gespliced Tissue Factor heeft geen functie in hemostase**

Vijftien jaar na de ontdekking van asTF is de rol van dit eiwit in de bloedstolling nog steeds onduidelijk. Reeds uitgevoerde studies laten zien dat, ondanks het missen van een functionele bindingsplaats voor FX, asTF toch minimale stollingscapaciteit bezit in de aanwezigheid van fosfatidylserine. Histochemische studies wijzen uit dat asTF aanwezig is aan

de rand van een groeiende trombus in muismodellen. Dit suggereert dat asTF een functie heeft in bloedstolling. Helaas bevatten de studies die tot nu toe waren uitgevoerd een aantal belangrijke nadelen die het interpreteren van de stollingsfunctie van asTF bemoeilijken; i) stimuleren van endotheelcellen met cytokines een behandeling die doorgaans leidt tot TF synthese- leidde niet tot detecteerbare asTF niveaus in endotheel cellen of in het supernatant en/of ii) experimenten aan de stollingsfunctie van asTF werden uitgevoerd in de afwezigheid van flTF, terwijl asTF expressie in de afwezigheid van flTF nooit is waargenomen. Daarom moeten de conclusies die getrokken worden uit deze studies met terughoudendheid worden geïnterpreteerd. Om het samenspel tussen asTF en flTF te bestuderen in endotheelcellen, werden deze eiwitten tegelijkertijd tot expressie gebracht waarna verschillen in stollingsactivatie van flTF werd onderzocht in **hoofdstuk 2**. De resultaten lieten zien dat relatief lage asTF concentraties geen effect hebben op flTF-afhankelijke stolling, niet op cellen noch op MVs. Co-lokalisatie experimenten lieten zien dat asTF en flTF zelfs in gescheiden cellulaire compartimenten voorkomen.

Gebaseerd op de resultaten in **hoofdstuk 2** kan er geconcludeerd worden dat asTF een beperkte rol heeft in stollingsactivatie, met minimale stollingsactiviteit en geen regulerende rol richting flTF. Desondanks is het mogelijk dat asTF een rol speelt in hemostase. Tot nu toe is asTF gedetecteerd in bloedstolsels en op bloedplaatjes (waar het de stollingspotentiaal zou kunnen verhogen). Binding van asTF aan  $\beta 1$  integrines stimuleert interacties tussen endotheelcellen en monocytten; met name deze monocytten zijn nauw betrokken bij de initiatie en propagatie een stolsel. Eerder werk heeft laten zien dat behandeling van microvasculaire endotheelcellen (MVECs) met asTF leidt tot verhoogde expressie en activiteit van cel adhesie moleculen zoals E-selectin, VCAM-1 en ICAM-1 om verdere monocyten binding te bevorderen. Dit ondersteunt het concept dat asTF monocyten functie in trombus vorming kan beïnvloeden. Trombus vorming zou verder nog bevorderd kunnen worden, door een 'klittenband' functie van asTF op cellen en MVs. Collier en collega's hebben eerder laten zien dat endotheelcellen reeds afgesnoerde TF<sup>+</sup> MVs kunnen internaliseren en deze pool aan TF terug naar het celmembraan recycleren, waardoor de stollingsactiviteit van deze cellen omhoog gaat. asTF kan mogelijk de fusie van TF<sup>+</sup> MVs met endotheelcellen bevorderen door integrines te activeren.

Als laatste lijkt asTF betrokken bij  $\beta 1$  integrine-afhankelijke verhoogde afsnoering van MV's in alveolekliertumorcellen, zonder de expressie niveaus van flTF te veranderen. In ons eigen onderzoek zagen wij geen asTF-afhankelijke verhoging van TF<sup>+</sup> MVs. Wellicht speelt het celtype een belangrijke rol in dit proces. Daarnaast verhoogt  $\beta 1$  integrine expressie op

MVs de TF-afhankelijke stollingsactivatie, omdat  $\beta 1$  integrine het macromoleculaire substraat bindingsplaats op TF optimaal positioneert. Ditzelfde model zou ook kunnen gelden in het geval van asTF. Het zou daarom interessant zijn om de effecten van asTF op VT *in vivo* te testen - in het aanwezigheid van een asTF-blokkerend antilichaam - teneinde de bijdrage van asTF aan trombus vorming te bestuderen. Als laatste is het aan te bevelen om asTF plasmaspiegels van VT-patiënten en controle individuen te bepalen zodat associaties tussen asTF niveaus en het risico op VT bepaald kan worden.

Onze studie toonde ook aan dat extreem hoge asTF concentraties leiden tot een verlaging van flTF expressie in non-raft membraan domeinen. Deze reductie in flTF op het celoppervlak resulteerde in verlaagde TF stollingsactiviteit zoals gemeten met FXa generatie experimenten. Het moet vermeld worden dat buitensporige concentraties van asTF zorgden voor verhoogde stress in het endoplasmatisch reticulum, wat tot uiting kwam door verhoogde BiP niveaus. We vonden ook dat asTF eiwit in een proteasoom-afhankelijke manier wordt afgebroken. Op basis van deze experimenten concluderen we dat extreem hoge asTF concentraties resulteren in de herkenning van 'incorrect' gevouwen TF en als gevolg daarvan tot flTF afbraak.

## 2. Stollingsfactoren dragen bij aan tumorprogressie

De bijdrage van stollingsfactoren aan tumorprogressie is uitgebreid bestudeerd. Stollingsfactoren kunnen tumorgroei beïnvloeden via diffusie van deze factoren vanuit bloed naar het tumormilieu vanwege lekkende bloedvaten. Echter, recent is ook gerapporteerd dat tumorcellen zelf in staat zijn om stollingsfactoren te maken. De rollen van bloed- en tumor-specifieke stollingsfactoren op tumorprogressie worden uitvoerig besproken in **hoofdstuk 3**. Het wordt duidelijk dat stollingsfactoren merkbaar bijdragen aan twee specifieke kenmerken van kanker: angiogenese en metastase. Zoals eerder beschreven, wordt angiogenese geïnduceerd door asTF in een  $\beta 1$  integrine-afhankelijke manier. Echter, daarnaast wordt angiogenese ook bevorderd door flTF/FVIIa- en trombine-afhankelijke activatie van Protease-activated Receptors (PARs), wat leidt tot verhoogde expressie en uitscheiding van proangiogene moleculen zoals IL8, VEGF en angiopoietine-1. Na intravasatie is overleving van de tumorcel in de bloedbaan sterk afhankelijk van stollingsactivatie door flTF teneinde een fibrine/plaatjes-rijke schild om de tumorcel te vormen. Dit schild beschermt de tumorcel tegen het immuunsysteem en andere schadelijke invloeden. Recentelijk werd tevens gerapporteerd dat von Willebrand factor (vWF) metastasering bevordert. Activatie van endotheelcellen door tumorcellen leidt tot het uitscheiden van vWF-draden, en deze draden kunnen de bloedplaatjes activeren en binden. Dit leidt uiteindelijk tot een binding-



splaats voor de tumorcel. Op deze manier kan de tumorcel ontsnappen aan de bloedstroom, het weefsel binnendringen en een secundaire tumor vormen.

## Tissue Factor signalering ondersteunt metastase

Om te kunnen metastaseren moeten tumorcellen een verandering ondergaan van een epitheliale naar een mesenchymale staat (epithelial-to-mesenchymal transition; EMT;). Het EMT proces is ook dynamisch gelinkt aan het ontstaan van kankerstemcellen (cancer stem cell; CSC;). Zoals al eerder gerapporteerd, beïnvloedt TF de migratie en CSC-eigenschappen van tumorcellen. Daarom hebben wij besloten om het mechanisme waarop TF deze processen beïnvloedt, te bestuderen. De resultaten van dit onderzoek staan beschreven in **hoofdstuk 4**. Wij laten zien dat Mab-10H10, een TF antilichaam dat specifiek TF signalering remt en niet de bloedstollings-functie, borstkanker metastasering remt via i) regulatie van EMT-geassocieerde (transcriptie) factoren met als gevolg een epitheliaal fenotype, ii) verminderde tumor-initiërende capaciteit door een vermindering van het aantal kankerstemcellen en iii) regulatie van integrine functie om zo de mesenchymale-staat verder te onderdrukken. Specifiek resulteerde behandeling van borstkankercellen met Mab-10H10 voor een dissociatie van het TF/ $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrine complex en tot een associatie van TF met  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 en  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 integrines. Dit laatste leidde tot vorming van focal adhesions en activatie van focal adhesion kinases. Dit leidde uiteindelijk tot een epitheliale cel morfologie met verminderde tumorigene eigenschappen en metastasering.

In ons onderzoek hebben wij gebruik gemaakt van de borstkankercellijn MDA-MB-231-mfp. Er moet vermeld worden dat deze cellijn ook lage hoeveelheden van asTF tot expressie brengt. In het onderzoek beschreven in dit hoofdstuk hebben wij niet onderzocht welke rol asTF heeft in metastasering. Tevens hebben we in **hoofdstuk 4** geen onderzoek gedaan naar potentiële, synergistische eigenschappen van asTF in de context van fITF functie. asTF wordt frequent tot overexpressie gebracht in alvleesklier- en borstkankertumoren, waar het - op een  $\beta$ 1 integrine-afhankelijke manier - angiogenese en proliferatie bevordert. Tevens stimuleert asTF metastasering in alvleesklierkankermodellen. In borstkanker komt asTF voornamelijk voor in ER<sup>+</sup> tumoren, en in deze tumoren vertoont asTF synergie met ER functie, hetgeen uiteindelijk leidt tot verhoogde celdeling. Van belang is dat in eerdere studies remming van  $\beta$ 1 integrine met een antilichaam, niet leidde tot volledige remming van asTF-afhankelijke proliferatie. Dit suggereert dat asTF mogelijk ook andere integrines kan binden teneinde borstkankerprogressie te beïnvloeden. Wij hebben in **hoofdstuk 4** reeds aangetoond dat  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 integrine expressie omhoog gaat na Mab-10H10 behandeling, en we achten het mogelijk dat asTF  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 integrine kan binden en activeren om zo verder bij

te dragen aan de epitheliale morfologie van de kankercellen. Dit is consistent met eerdere studies die laten zien dat MVEC cellen in de aanwezigheid van asTF een verhoogde expressie vertoonden van cellulaire adhesie moleculen. Het belang van interacties tussen asTF en  $\beta_4$  integrine voor celadhesie, capillair formatie en migratie van endotheelcellen is eerder onderzocht en uitgesloten, maar de functie van  $\beta_4$  integrine en asTF in kankercellen is nog niet uitgezocht.

Het is onwaarschijnlijk dat asTF een dominante rol speelt in kanker-geassocieerde angiogenese in het borstkanker model dat gebruikt is dit proefschrift; wij hebben eerder aangetoond in dit model dat asTF de proliferatie van tumorcellen beïnvloed, en niet de angiogenese. Echter asTF lijkt wel degelijk een rol te hebben in angiogenese in een borstkanker model op basis van MCF-7 cellen – een cellijn die normaliter geen fITF tot expressie brengt – en in alveolairkanker modellen waarin werd aangetoond dat asTF angiogenese stimuleert op een  $\alpha\beta_1$  integrine-afhankelijke manier. Een aantal factoren zouden deze tegenstrijdigheid kunnen verklaren: i) asTF expressie niveaus in MDA-MB-231-mfp zijn laag ten opzichte van de artificiële overexpressiemodellen in andere onderzoeken; ii) asTF zou betrokken kunnen zijn bij fysiologische angiogenese maar niet bij pathologische angiogenese in de aanwezigheid van fITF en iii) fITF vangt alle  $\beta_1$  integrine receptoren weg van het celmembraan, waardoor het binding van asTF aan integrines en daarmee intracellulaire signalering voorkomen wordt. Het zou interessant zijn om bovenstaande mogelijkheden uit te zoeken om zo een mogelijk samenspel tussen asTF en fITF in tumor-geassocieerde angiogenese aan het licht te brengen.

Tot nu toe was de focus van dit proefschrift voornamelijk gericht op veranderingen binnen de kanker cel voorafgaand aan metastase. Een ander proces dat betrokken is aan metastase, maar niet onderzocht binnen de context van dit proefschrift, is de afsnoering van MVs en hun opname door distaal gelegen cellen. Volgens de 'seed-and-soil' hypothese van Stephen Paget, waarin hij metastaserende cellen vergelijkt met plantenzaadjes, kunnen tumorcellen alleen uitgroeien in een metastatische niche als het tumormilieu gunstig voor deze cellen is. In de afgelopen jaren is aangetoond dat MVs orgaan-specifieke metastase kunnen veroorzaken door de pre-metastatische niche te veranderen ten gunste van de metastaserende cel. Deze voorbereiding door MVs voorafgaand aan metastase is afhankelijk van integrine expressieprofielen op de MVs. Zo dragen  $\alpha v\beta_5$  integrine-positieve MVs voornamelijk bij aan lever-specifieke metastase, terwijl  $\alpha\beta_1$  en  $\alpha\beta_4$  integrine-positieve MVs met name bijdragen aan de 'homing' van circulerende tumorcellen naar de longen. Er is uitvoerig onderzoek gedaan naar TF<sup>+</sup> MVs met betrekking tot tumorprogressie. Da Rocha Rondon en collega's

hebben recentelijk met behulp van het CRISPR/Cas9 editing aangetoond dat TF knock-out in MDA-MB-231 cellen zorgt voor verminderde afsnoering van MVs. Bovendien is aangetoond dat fosforylatie van TF op de aminozuren Ser253 en Ser258 fungeert als een soort "aan-en-uit" knop voor het opnemen van TF in de MVs. Wij stellen daarom voor dat inhibitie van TF signalering met Mab-10H10 zou kunnen leiden tot een vergelijkbaar vermindering van MV afgifte, te meer omdat Mab-10H10 cytoplasmatische fosforylatie van TF door PAR2 voorkomt. Daarnaast zou het interessant zijn om te bestuderen of TF een rol speelt in de opname van integrines in MVs, en zo orgaan-specifieke metastasering zou kunnen beïnvloeden.

### **3. Het achterliggende moleculaire mechanisme van kanker-geassocieerde trombose**

Kanker-geassocieerde trombose is een vaak voorkomende complicatie en draagt bij aan hoge morbiditeit en mortaliteit. Doordat de mechanismen die ten grondslag liggen aan CAT onvolledig begrepen worden, is het een uitdaging om de patiënten die een verhoogd risico hebben op trombose te selecteren voor profylactische antistollingsmedicatie. Vandaar dat er aandacht uitgaat naar CAT in het derde gedeelte van dit proefschrift. In **hoofdstuk 5** is een muismodel ontwikkeld om effecten van kanker op trombose te onderzoeken. De meest-gebruikte muismodellen voor VT zijn erg invasief; teneinde VT te induceren moeten de dieren een operatie ondergaan waarbij de aderen blootgelegd moeten worden. Een ander nadeel van de huidige diermodellen is dat ze de pathologische aard van trombus vorming niet goed nabootsen. Het veelgebruikte ijzerchloride model berust op de inductie van oxidatieve stress in de vaten. Ondanks dat dit een relatief simpel model is, bootst het niet de klinische en biologische factoren na die het ontstaan van een trombus bepalen. In het 'inferior vena cava (IVC) stenosis' model wordt de vena cava gedeeltelijk afgebonden, waarbij schade aan de vaten wordt voorkomen. In dit stenose model is het ontstaan van VT afhankelijk van immuuncellen zoals leukocyten en neutrofielen, waarbij neutrofielen pro-trombotische 'Neutrophil Extracellular Traps' kunnen uitstoten. Dit model is dan ook een betere representatie van Diep Veneuze Trombose (DVT) in mensen. Helaas is dit model onderhevig aan enorme variatie in de uitkomsten, en ontstaat het bloedstolsel tegen de richting van de bloedstroom in. Op basis van deze overwegingen hebben wij een nieuw niet-invasief spontaan VT model ontwikkeld waarin aanmaak van antitrombine in de lever wordt uitgeschakeld, door middel van intraveneuze siRNA injecties. Verlaagde expressie van antitrombine leidt tot een verstoord evenwicht in het stollingsmechanisme met VT en bloedingen in de hoofden van de muizen als gevolg. In **hoofdstuk 5** constateren wij dat muizen met borstkanker gedeeltelijk gered worden van deze hemostatische afwijkingen. Deze pro-trombotische be-

handeling had op korte termijn geen effecten op tumoreigenschappen, zoals tumorgroei en metastase. Daarnaast zorgde de aanwezigheid van een borsttumor voor verhoogde niveaus aan bloedplaatjes, fibrinogeen en een systemische ontstekingsmediatoren. Dit alles werd niet beïnvloed door verlaging van antitrombine. Nader onderzoek van de organen liet een verhoogde vorming van fibrine zien in de levers van muizen zonder een tumor, terwijl de muizen die kanker ontwikkelden hoge fibrine vorming lieten zien in de tumor. Een interessante bevinding was dat er minder vaak macrovasculaire trombose werd aangetroffen in de grote aderen van deze muizen, daar waar vorming van deze grote trombi juist een fenotype is dat geassocieerd is met verlaagde antitrombine niveaus in muizen.

In tegenstelling tot de hypothese, werd er minder vaak een trombose-geassocieerd fenotype geobserveerd in muizen met een tumor. Dit zou verklaard kunnen worden door verhoogde aanwezigheid van bloedplaatjes in het plasma van deze muizen. Wij stellen nu de hypothese dat het beschermende werking van de aanwezigheid van een tumor wordt veroorzaakt door een gebrek aan complete consumptie van plaatjes in muizen die borstkanker hebben. De verhoogde aantallen bloedplaatjes in deze muizen zou in mensen gelijk zijn aan trombocytose. Ter ondersteuning van deze bevindingen, trombocytose is geassocieerd met metastasering en inflammatoire borstkanker. Daarnaast suggereert het fenotype wat zich voordoet in muizen met tumoren als diffuse intravasale stolling (DIC; disseminated intravascular coagulation), wat is gedefinieerd door bijvoorbeeld lage antitrombine niveaus, fibrine producten, consumptie van bloedplaatjes, veneuze trombose en/of bloedingen. DIC komt voor in 5% van alle borstkanker gevallen en is de meest extreme vorm van hyperstolling. Aangezien deze extreme vorm werd waar genomen, zou het van groot belang zijn om het MDA-MB-231 borstkanker model te combineren met het klassieke IVC stenose model. In muis alveesklierkanker modellen werden er grote bloedstolsels ontdekt in muizen met tumoren vergeleken met muizen zonder tumoren. Daarnaast was het ontstaan van een trombus afhankelijk van TF<sup>+</sup> MVs. Echter, wij vonden in ons borstkankermodel geen aanwijzingen voor een TF-afhankelijke hyper-coagulante fenotype, die het bestuderen van CAT in een TF<sup>+</sup> MVs onafhankelijke manier rechtvaardigt.

Een andere aanpak om betrokkenheid van belangrijke 'sleutelfactoren' en biologische signaleringsroutes te bestuderen in CAT is het bestuderen van tumor gen expressie en deze expressie profielen te koppelen aan VT. Het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 6** is de allereerste studie die aantoont dat tumoren van patiënten met zowel darmkanker (CRC; colorectal cancer) en VT een ander gen expressie profiel vertoont dan in tumoren van patiënten die alleen darmkanker hebben. Een inflammatoire staat werd aangetoond in tu-

moren van patiënten met CAT, en verhoogde niveaus van fibrine afzettingen waren aanwezig in tumoren van patiënten met VT. Verhoogde fibrine producten kunnen dienen als een matrix voor tumor-geassocieerde bloedvatvorming, of kunnen uitzaaiing bevorderen, hetgeen allemaal kan bijdragen aan verminderde overleving van patiënten met CAT. Wanneer patiënten met VT werden onderverdeeld in de 2 groepen: VT vòòr (max 1 jaar), en VT rondom (max 3 maanden) kanker diagnose, werden verschillende expressie profielen gevonden. Dit zou kunnen komen door kanker-gerelateerde behandelingen, omdat signaleringsroutes die gerelateerd zijn aan metabolisme verhoogd waren in de 'VT rondom diagnose' groep.

Om het pathofysiologische mechanisme van CAT in zijn geheel te kunnen begrijpen, ongeacht de kankerbehandeling, zijn de top 3 genen die differentieel tot expressie kwamen in CRC patiënten met VT voorafgaand aan kankerdiagnose erg interessant voor verder onderzoek, te meer omdat er verbanden gelegd kunnen worden met factoren die gerelateerd zijn aan de stolling. *Reg4* is een voorbeeld van een gen dat hoger tot expressie kwam in de VT vòòr diagnosegroep; dit eiwit kan in afwezigheid van calcium binden aan heparine, een van nature in het lichaam voorkomend stolling remmend molecuul. *Spink4* is een Kazal-type serine protease inhibitor en zou in staat kunnen zijn om stollingsfactoren te remmen. Ten slotte is co-expressie van *Reg4* en *spink4* strikt gereguleerd in inflammatoire darmaandoeningen, wat suggereert dat een (chronische) pro-inflammatoire staat verder kan bijdragen aan VT, wellicht via verhoogde expressie van TF. Eén op de vijf mensen met een inflammatoire darmaandoening wordt gediagnosticeerd met kanker. Tevens hebben zij een 2-3 maal verhoogde kans op het krijgen van VT. Daarnaast is verhoogde expressie van *Reg4* geassocieerd met tumorprogressie, uitzaaiing en een verlaagde kans op overleving. Een wat directer verband met stollingsregulatie is er bij het eiwit *SERPINA1*, dat codeert voor het eiwit  $\alpha$ 1-antitrypsine (*A1AT*). *A1AT* kan direct en indirect trombus formatie stimuleren door verschillende remmers van het stollingsstelsel, zoals geactiveerd eiwit C te remmen. Complexvorming van *A1AT* met elastase zou systemisch neutrofiel activatie tot gevolg kunnen hebben en VT kunnen veroorzaken via Neutrophyl Extracellulair Traps. Bovendien is de aanwezigheid van *A1AT* in fibrine-rijke bloedstolsels aangetoond, wat een directe rol voor dit eiwit in VT suggereert. Met betrekking tot kanker is *A1AT* overexpressie gevonden in verscheidene tumoren zoals hersen-, darm- en maagkanker. In recente studies werden ook patiënten met verhoogd risico op VT geïnccludeerd, alhoewel objectief vastgestelde VT in deze patiënten geen primair eindpunt was. Daardoor is het nog onduidelijk of er directe associaties zijn tussen *A1AT* plasmaniveaus en VT.

Helaas hebben de meeste studies die geprobeerd hebben biomarkers voor CAT te vinden zich met name gericht op stollingsfactoren, met een nadruk op TF in kanker-geassocieerde trombose. Een nog belangrijkere conclusie is dat wetenschappers en artsen, wellicht onterecht, geprobeerd hebben om klassieke risicofactoren voor VT te extrapoleren naar CAT, wat uiteindelijk heeft geresulteerd in weinig succes in het vinden van biomarkers die CAT voorspellen. Verschillende voorspel- en risicomodellen zijn ontwikkeld om te kunnen voorspellen welke kankerpatiënten een verhoogd risico hebben op VT, helaas, met een lage nauwkeurigheid. In **hoofdstuk 7** pleiten wij om te stoppen met het gebruiken van klassieke risicofactoren als voorspellers van CAT, met name, omdat studies met behulp van plasma proteomics, laat zien dat eiwitprofielen in plasma van patiënten met CAT, verschillen van de profielen in plasma van patiënten met alleen kanker of VT. Ten slotte hebben wij de verbanden tussen mutaties en verhoogd risico op CAT besproken. Omdat het een zeer 'biased' en tijdrovende benadering is om alle genen te onderzoeken met betrekking tot CAT, stellen wij daarom een objectieve aanpak voor om moleculaire profielen in patiënten met CAT te bepalen, zoals beschreven in **hoofdstuk 6**.

## Conclusies en toekomstperspectieven

Dit proefschrift beschrijft i) de functie van asTF in hemostase, ii) de bijdrage van stollingsfactoren aan tumorprogressie, en iii) het verbreedt ons standpunt met betrekking tot kanker-geassocieerde trombose. Remming van TF signaaltransductie met het antilichaam Mab-10H10 zorgt voor verminderde EMT- en CSC-geassocieerde transcriptie programma's, tumor-initiërende capaciteit en metastase in triple negatieve borstkanker (TNBC; triple negative breast cancer) cellijn. Omdat dit een tumor variant is die zeer lastig is te behandelen en het een hoge kans op recidief heeft, zou het interessant zijn om TF signalering als therapeutisch aangrijpingspunt te nemen. Tweeledige behandeling van TNBC met conventionele chemotherapie en Mab-10H10 zou kunnen resulteren in een betere behandelingsstrategie, omdat dit zowel gericht is tegen de kankerstemcellen en de zeer proliferatieve dochtercellen.

Daarnaast laten wij een 'proof-of-principle' onderzoek zien waarin wordt beschreven hoe er 'unbiased' gezocht kan worden naar nieuwe biomarkers in CAT patiënten. Uitbreiding van deze studie door deze biomarkers te valideren in andere patiëntcohorten en andere tumor typen zal zorgen voor nieuwe inzichten in het mechanisme dat ten grondslag ligt aan kanker-geassocieerde trombose. Uiteindelijk zal dit leiden tot een beter voorspellingsmodel om de patiënten met een verhoogd risico op VT te selecteren en diegenen die wellicht profijt kunnen hebben van profylactische antistolling te behandelen.