



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Regulation of signal transduction pathways by hypoxia in breast cancer subtypes

Liu, Q.

Citation

Liu, Q. (2023, February 9). *Regulation of signal transduction pathways by hypoxia in breast cancer subtypes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3561397>

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/1887/3561397>

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

Appendix

Samenvatting

Borstkanker heeft een hoog sterftcijfer in vrouwen wereldwijd. Hierin zijn vaak de metastasen, in plaats van de primaire tumor, de doodsoorzaak. Tumorcellen ondergaan hypoxie, wat gepaard gaat met wijzigingen in cel metabolisme, en wat metastasering kan veroorzaken door het initiëren van epitheliale-mesenchymale transitie (EMT) in tumorcellen. Huidige behandelingen, waaronder chemotherapie, stralingstherapie, chirurgische resectie en gerichte hormoontherapie, verlengen de levensverwachting en verminderen de mortaliteit van deze ziekte enorm. Echter, de sterftkans blijft hoog wanneer metastasen en resistentie tegen medicijnen zich ontwikkelen. Vooral in triple negatieve borstkanker, waar de cellen de expressie van ER, PR en HER2 genen missen. Hierdoor is borstkanker nog steeds een van de meest fatale vormen van kanker in vrouwen. Alhoewel de mechanismen van borstkanker progressie uitgebreid onderzocht zijn is verder onderzoek noodzakelijk om nieuwe therapeutische doelwitten te vinden en de behandelingen in deze patiënten te verbeteren.

Hoofdstuk 1 dient als een introductie voor dit proefschrift. In **Hoofdstuk 2** worden de huidige methoden van hypoxie onderzoek besproken om zo te ontdekken hoe blootstellingsregimes die worden gebruikt in experimenten verbonden zijn aan signalering door verschillende hypoxie induceerbare factoren (HIFs) en om cellulaire reacties te onderscheiden in de context van de kenmerken van kanker. We bespreken de discrepanties in bestaande literatuur over hypoxie onderzoek binnen het veld van borstkanker en stellen een duidelijke definitie van acute, chronische en periodieke hypoxie voor, gebaseerd op HIF activatie en cellulaire reacties: (i) acute hypoxie is wanneer de cellen worden blootgesteld voor niet meer dan 24 uur aan een omgeving met 1% O₂ of minder; (ii) chronische hypoxie is wanneer de cellen worden blootgesteld voor meer dan 48 uur aan een omgeving met 1% O₂ of minder en (iii) periodieke hypoxie is wanneer de cellen worden blootgesteld aan minstens twee rondes van hypoxie (1% O₂ of minder) gescheiden door minstens één periode van reoxygenatie door blootstelling aan normoxie (8.5% O₂ of hoger). Dit geeft een richtlijn voor de definitie van hypoxie gerelateerde termen en een duidelijke basis voor hypoxie gerelateerde *in vitro* (borst) kankeronderzoek.

Hypoxie is gekoppeld aan het ziekteverloop en slechte prognoses in verschillende kanker soorten, inclusief borstkanker. Kankercellen kunnen acute, chronische en/of periodieke periodes van zuurstof vermindering ondergaan. Het is onbekend hoe de verschillende subtypes van borstkanker reageren op zulke hypoxieregimes. In **Hoofdstuk 3** beoordelen we de reactie van representatieve cellijnen, voor lumaal en basaal A subtypes, op acute en chronische hypoxie. 'High throughput' gerichte transcriptomics analyse laat zien dat HIF gerelateerde routes significant worden geactiveerd in beide subtypes. Hetzelfde was te zien voor HIF1 α nucleaire accumulatie en inductie van het HIF1 α doelwit gen, CA9. Gebaseerd op het aantal differentieel tot expressie gebrachte genen kunnen wij de volgende conclusies trekken: i) 5 dagen blootstelling aan hypoxie induceert een meer diepgaande transcriptionale reprogrammering dan 24 uur blootstelling, ii) basaal A cellen waren minder getroffen door acute en chronische hypoxie in vergelijking met lumaal cellen. Hypoxie-gedreven gen netwerken waren geïdentificeerd, waarvan hub genen werden geassocieerd met een slechte overlevingskans voor patiënten.

Opmerkelijk, terwijl chronische hypoxie de regulatie van de celcyclus in beide subtypen verandert, induceert het twee verschillende adaptatie programma's in deze subtypes. Chronische hypoxie heeft een effect op genen die het centrale koolstofmetabolisme in de luminale cellen besturen, terwijl in basaal A cellen genen die het cytoskelet besturen beïnvloed worden. In overeenstemming daarmee, lieten basaal A cellen een verhoging zien in cel migratie geassocieerd met meer F-actine stress kabels, terwijl luminale cellen dit niet deden. Samenvattend, deze gegevens laten verschillende reacties zien op acute en chronische hypoxie, die ook aanzienlijk verschillen tussen luminale en basaal A cellen, wat een rol kan spelen in de progressie van deze verschillende borstkanker subtypes.

In **Hoofdstuk 4** bestuderen we de communicatie tussen hypoxie en de extracellulaire matrix (ECM) en beoordelen hun invloed op borstkanker progressie. De bevindingen duiden erop dat hypoxische signalering invloed heeft op meerdere mechanismen die direct invloed hebben op ECM-herstructurering, uiteindelijk leidend tot een verhoging van de agressiviteit van borstkanker. Ten tweede, hypoxie en de ECM werken samen om de verschillende aspecten van cel metabolisme te veranderen. Er vindt wederzijdse versterking plaats van aerobe glycolyse via het verhogen van glucose transport, glycolytische enzymen en door het reguleren van de intracellulaire pH. Beide wijzigen lipiden- en aminozuurmetabolisme door het stimuleren van lipide en aminozuur opname en synthese, waardoor de tumor wordt voorzien van extra energie voor groei en metastasering. Ten derde, YAP/TAZ signalering wordt niet alleen gereguleerd door de tumor micro-omgeving en cel metabolisme, maar het wordt primair ook gereguleerd door zijn doelwit c-Myc. Dit hoofdstuk zorgt voor een beter inzicht in de communicatie tussen hypoxie en de ECM in borstkanker. Daarnaast wijst het naar een rol voor het YAP/TAZ mechanotransductie pad als een belangrijke link tussen hypoxie en de ECM in de tumor micro-omgeving, die voor borstkanker progressie stimuleert.

In welke hoedanigheid borstkanker subtypen verschillen in hun reactie op hypoxie is een belangrijke vraag gezien de verschillen in prognose. In **Hoofdstuk 5** laten we zien dat hypoxie HIF1 stabilisatie op dezelfde manier stimuleert in luminale en basaal A triple negatieve borstkankercellen en we gebruiken 'high throughput' gerichte RNA sequencing om de effecten op genexpressie in deze subtypes te analyseren. We focussen op de regulatie van YAP/TAZ/TEAD doelwitten en vinden overlappende evenals verschillende doelwit genen die gemoduleerd worden in luminale en basaal A cellen die hypoxie ondergaan. We onthullen een HIF1 gemedieerde, basaal A specifieke, reactie op hypoxie waarbij TAZ, maar niet YAP, wordt gefosforyleerd op Ser89. Terwijl totale YAP/TAZ lokalisatie niet wordt beïnvloed door hypoxie, drijft hypoxie een verplaatsing van [p-TAZ(Ser89)/p-YAP(Ser127)] van de nucleus naar het cytoplasma in basaal A, maar niet luminale borstkankercellen. Cel fragmentatie en YAP 'knock-out' experimenten bevestigen cytoplasmatische localisatie van p-TAZ(Ser89) in hypoxische basaal A cellen. Farmacologische en genetische interventie experimenten identificeren c-Src en CDK3 als kinases die betrokken zijn bij de fosforylering zoals die van TAZ op Ser89 in hypoxische basaal A cellen. Hypoxie verzwakt de groei van basaal A cellen en het effect van verteporfin, een verstoorder van YAP/TAZ-TEAD-bemiddelde transcriptie, is verminderd onder deze condities. De expressie van een TAZ-S89A mutant geeft geen groei voordeel aan basaal A cellen onder hypoxische omstandigheden wat impliceert dat andere hypoxie gereguleerde routes, die celgroei onderdrukken, dominant zijn.

In **Hoofstuk 6** bestuderen we CSE1L in borstkanker onder normoxie en hypoxie. In een gerichte RNAseq dataset zien we dat de blootstelling van basaal-achtige borstkankercellen in chronische hypoxie de expressie van CSE1L mRNA vermindert. Opmerkelijk, CSE1L eiwit levels waren vergelijkbaar en onaangetast in hypoxie in lumaal, basaal-A en basaal-B cellen, maar chronische hypoxie stimuleerde CSE1L eiwit accumulatie in de nucleus. 'Knockdown' van CSE1L veranderde de expressie van EMT transcriptie factoren, verminderde de expressie van N-cadherin en wijzigde de migratie van basaal A en B cellijnen onder chronische hypoxie. In een gepubliceerde dataset hebben we een YAP/TAZ/TEAD bindingsplek geïdentificeerd. Het remmen van het WWTR1 gen, coderend voor TAZ, leidde tot een verdere vermindering van CSE1L mRNA expressie onder hypoxie condities en behandeling met verteporfin, een inhibitor van YAP/TAZ signalering, zorgde voor een reductie in CSE1L eiwit levels. Ten slotte, gerichte RNAseq identificeerde een CSE1L co-gereguleerd netwerk wat een gedeelde vermindering in reactie op hypoxie en TAZ vermindering laat zien, wat klinische relevantie heeft voor borstkanker. Alomvattend, deze bevindingen onthullen nieuwe connecties tussen hypoxie, TAZ en CSE1L in borstkankercellen.

De conclusie van de verschillende hoofdstukken van dit proefschrift worden bediscussieerd in **Hoofstuk 7**, die ook de toekomstperspectieven in onderzoek bevat.