



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unraveling multifaceted roles of Grainyhead-like transcription factor-2 in breast cancer

Coban, B.

Citation

Coban, B. (2024, November 5). *Unraveling multifaceted roles of Grainyhead-like transcription factor-2 in breast cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4107667>

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/1887/4107667>

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

Appendix

Nederlandse samenvatting

List of commonly used abbreviations

Curriculum vitae

List of publications

Nederlandse samenvatting

Borstkanker is wereldwijd de meest voorkomende vorm van kanker bij vrouwen en uitzaaiing beperkt de effectiviteit van doelgerichte therapieën. Daarom zijn er nieuwe strategieën nodig om uitzaaiing tegen te gaan. De snelle aanpassing van tumorcellen vereist de identificatie van belangrijke regulatoren zoals epitheliale-mesenchymale transitie (EMT). Hoewel EMT niet de enige factor is in uitzaaiing, bevordert het dit wel en wordt het gereguleerd door een netwerk van transcriptiefactoren (EMT-TF's). Dit proefschrift richtte zich specifiek op de verschillende rollen van Grainyhead-like 2 (GRHL2) in verschillende borstkankersubtypes, met als doel nieuwe mechanistische en doelgerichte inzichten te verschaffen.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de biologie van borstkanker, met de nadruk op een belangrijke familie van transcriptiefactoren -Grainyhead-like- die de progressie en uitzaaiing van borstkanker beïnvloeden en hun rol in normale fysiologie en maligniteiten. In **hoofdstuk 2** gingen we verder met het begrijpen van de moleculaire en fysische factoren in de nabije omgeving van de tumorcellen (de “tumor microenvironment” (TME)) die leiden tot uitzaaiing. We hebben de mechanische aspecten van de TME en het aanpassen van de TME door tumorcellen uitgewerkt op basis van de bestaande literatuur. Later bespraken we de migratiestrategieën van tumorcellen en hoe deze worden gestuurd door twee fenomenen: “unjamming” en gedeeltelijke EMT. Potentiële therapeutische benaderingen voor het aanpakken van de TME en de gedeeltelijke EMT werden voorgesteld om uitzaaiing te overwinnen. Deze analyse biedt inzicht in de wisselwerking tussen fysieke en moleculaire signalen die de verspreiding van tumorcellen vanuit de primaire tumor ondersteunen en hoe nieuwe doelgerichte strategieën kunnen worden ontwikkeld.

GRHL2 blijkt een dubbele rol te spelen als bevorderaar van tumor groei en onderdrukker van metastasering in verschillende kankertypes, waaronder borstkanker. De specifieke functies van GRHL2 in verschillende borstkankersubtypes zijn echter slecht gedefinieerd in de literatuur. In **hoofdstuk 3** analyseerden we de genregulatiernetwerken van GRHL2 in het lumbinale borstkankersubtype. Genomische gebieden die door GRHL2 worden bezet, zijn

geïdentificeerd met behulp van een ChIP-seq studie en dit heeft mogelijke doelen van GRHL2 in lumbale borstkanker afgebakend. Er is eerder gemeld dat GRHL2 betrokken is bij de regulatie van de oestrogeen receptor (ER) en zijn pioniersfactoren GATA3 en FOXA1. Daarom onderzochten wij in hoeverre GRHL2 bindingsplaatsen deelt met deze factoren en ontdekten dat de overlap beperkt was. Om het GRHL2-gereguleerde transcriptoom te bepalen, ontwikkelden we een induceerbaar GRHL2 knock-out (KO) model in de MCF-7 lumbale borstkankercellijn en voerden we Bru-seq analyse uit. Een geïntegreerde aanpak die ChIP- en Bru-seq-studies combineerde, identificeerde nieuwe directe GRHL2-doelwitgenen, waaronder zijn rol in proliferatie door de transcriptionele activering van ETS- en E2F-transcriptiefactoren. Aangezien GRHL2 een hoofdregulator van EMT is, beoordeelden wij de transcriptionele controle over EMT-gerelateerde genen. GRHL2 bleek CLDN4 rechtstreeks te reguleren. Echter, zowel ChIP- als Bru-seq-analyses sloten de directe controle van andere targets, zoals CDH1 en ZEB1, door GRHL2 in lumbale borstkankercellen uit. De relatie tussen GRHL2 en zijn transcriptionele targets werd verder klinisch gevalideerd in zowel ER-positieve als ER-negatieve borstkankerpatiënten. Het onderzoek toonde nieuwe gennetwerken en doelen aan die door GRHL2 worden gecontroleerd, evenals de unieke rol van GRHL2 bij het reguleren van EMT.

Hoofdstuk 4 onderzocht de invloed van GRHL2-verlies in diverse biologische processen in lumbale en basale borstkankers. Er werden verschillende niveaus van GRHL2 expressie waargenomen in de verschillende borstkanker-subtypes. GRHL2 expressie bleek geassocieerd te zijn met een slechtere uitkomst voor de patiënt en was significant gedownreguleerd in het basale B subtype vergeleken met andere borstkankersubtypes. Wij toonden aan dat GRHL2-verlies in lumbale en basale A-subtypes resulteerde in celcyclusstilstand. Bovendien verbeterde het de migratiemogelijkheden van basale A-cellen, maar had het geen invloed op de migratie van lumbale cellen. In lumbale cellen was er een afname van de epitheliale marker E-cadherine, terwijl er daarnaast in basale cellen ook nog een toename was van de mesenchymale markers Vimentine en N-cadherine. Om de invloed van GRHL2 op groei en EMT te evalueren, onderzochten we een basaal A tumormodel waarin

GRHL2 niveaus experimenteel verlaagd waren in vivo. De verlaagde GRHL2 niveaus resulteerden in verminderde tumorgroei en verminderde uitzaaiing naar de longen, wat bevestigt dat groeionderdrukking, maar niet een verhoogde EMT-gestimuleerde uitzaaiing, een gevolg is van GRHL2-verlies.

In hoofdstuk 5, concentreerden we ons op de rol van GRHL2 in EMT en de signaalwegen die het reguleert in het basale B-subtype. In overeenstemming met hoofdstuk 4 zagen we weinig GRHL2 expressie in basale B cellen. Daarom hebben we de expressie van GRHL2 in deze cellen verhoogd, zowel stabiel als conditioneel. Deze overexpressie induceerde echter geen mesenchymale naar epitheliale overgang (MET), wat erop wijst dat GRHL2 overexpressie op zichzelf onvoldoende is om de EMT/MET-balans in het basale B-subtype te beïnvloeden. Het overheersende effect van GRHL2 op celgroei gold niet voor dit subtype. Om de GRHL2-gereguleerde signalering van basale B-cellen te onderzoeken, gebruikten we een high-throughput screening met kinase remmers. Het effect van vier kinase remmers leek beïnvloed te zijn door GRHL2, maar verdere validatie is nodig om GRHL2-gemedieerde reacties te bevestigen.

Hoofdstuk 6 bracht een nieuwe rol voor GRHL2 in immuunmodulatie aan het licht. Er werd ontdekt dat NT5E, dat codeert voor het ecto-enzym CD73, dat verantwoordelijk is voor de productie van adenosine in de TME, een direct doelwit is van GRHL2 in luminale cellen. Verlies van GRHL2 leidde tot verhoogde expressie van NT5E op zowel mRNA- als eiwitniveau, wat resulteerde in hogere extracellulaire adenosine niveaus. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat hoge adenosine niveaus in de TME het gedrag van T-cellen beïnvloedt en hun cytotoxiciteit remt. Wij toonden aan dat deze verhoging de migratie van CD8+ T-cellen bevordert. Deze studie heeft ons inzicht in de rol van GRHL2 en de invloed ervan in de immuunoncologie vergroot door een nieuwe signalerings route te identificeren. In **hoofdstuk 7** bespraken we de conclusies van elk hoofdstuk in dit proefschrift en schetsten we toekomstige onderzoeksperspectieven.