

Spredningsmekanismer innenfor kreft

Ahmad Qais Yawary & Ata-ur-Rehman Zahid



Odontologisk fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Veileder: Professor Magne Bryne

Abstrakt

Spredningsmekanismer for kreft vil alltid være ett viktig tema for å forstå kreftutvikling. Kreftutvikling er en kompleks prosess bestående av en rekke komplekse og varierte signalveier. Mange av disse signalveiene innebærer mekanismer for hvordan kreftceller utvikler evnen til å spre seg til andre vev ved hjelp av invasjon, migrasjon og kolonisering. En viktig brikke i denne spredningen er blant annet epithelial mesenchymal transition (EMT). I denne artikkelen vil vi se nærmere på EMT og andre aspekter og signalveier som spiller en rolle for kreftspredning i kroppen og dermed også i munnhulen

Innledning

De tidlige fasene i kreftutvikling begår på at kreftceller multipliserer i området hvor de første cellene begynte med ukontrollert proliferasjon. Resultatet av dette blir med tid det som kjennetegnes som en primær tumor. Primære tumorer vil i små størrelser være vanskelig å detektere, og vil som regel være av vesentlig størrelse før pasient eller praktiserende lege kan lokalisere dem. Lokalisasjonen til disse tumorene har betydning for om pasienten vil erfare noe ubehag eller symptomer. Er tumoren lokalisert i plastiske vev som pleurahulen vil tumorer i mindre størrelse ha mindre å si grunnet vevets plastiske evne og hulrommets størrelse. Derimot vil en tumor i hjernen gi raskere symptomer grunnet hjernens funksjon og egenskaper. Dette blir mindre viktig med tid ettersom tumorene blir veldig store om det ikke utøves noe behandling. Store tumorer kan hindre funksjonen til de vevene de befinner seg i og kan dermed i verste tilfelle være fatale. Primære tumorer er ansvarlig for 10% av dødsårsakene grunnet kreft. Gjenværende 90% skyldes metastaserende tumorer i andre vev enn primær tumor stedet. Disse metastasene dannes av kreftceller som forlater primær tumoren og sprer seg til andre vev gjennom sirkulasjonssystemet eller lymfesystemet i kroppen. De kan etter å ha forlatt blod eller lymfesirkulasjonen danne mikrokolonier i andre vev som vil med tid bli store nok til å kunne hindre funksjon og bli fatale. Det er denne metastaseringen og koloniseringen i andre vev som gjør kreftbehandling utfordrende. Siden metastase allerede foregår før den primære tumoren vanligvis blir funnet og fjernet blir prognosen på behandlingen usikker. Metastase kolonier vil i denne tiden bestå av veldig små kolonier som ikke kan lokaliseres, noe som vil gi mulighet til kun observasjon. Derfor er det viktig å kunne lokalisere primære tumorer

så tidlig som mulig for å hindre at metastaser skjer. ¹⁷

Majoriteten (80%) av livstruende tumorer kommer fra epitelial vev og mye av det som diskuteres videre vil være basert på slike tumorer. Tumorer er i definisjonen benigne så lenge tumorcellene ikke har trengt gjennom basalmembranen. I det kreftceller begynner å penetrere basalmembranen klassifiseres tumoren som malign. Det er denne invasive egenskapen som anses som farlig i tumorer. Gjennom denne evnen vil kreftceller kunne spre seg til andre organer og vev ved å trenge gjennom basalmembranen og så videre inn i blodkretsløpet eller lymfesirkulasjonen for spredning. Invasjon av kreftceller i sirkulasjonssystemet kalles for intravasasjon. Inne i sirkulasjonen er kreftcellene avhengig av å binde seg til noe solid substans for å unngå å dø gjennom anoksis, en form for apoptose som skyldes når celler løsner fra noe fast vev. Miljøet i sirkulasjonen er svært ugunstig for kreftceller noe som medfører at mange kreftceller dør ut her. For de kreftcellene som overlever den farlige strømmen blir neste oppgave å forlate sirkulasjonen for å danne kolonier i andre vev. Denne vandringen ut av sirkulasjonen kalles for ekstravasasjon. Dette innebærer ulike komplekse signalveier mellom kreftcellene og åreveggen. Kreftcellene kan bruke ulike strategier til å komme seg gjennom åreveggen. En måte er å feste seg til åreveggen og starte proliferasjon og gjennom dette presse seg ut gjennom veggen ved å dytte andre celler til side. Etter å ha forlatt sirkulasjonen kan kreftceller begynne neste steg i kreftutviklingen kalt kolonisering. Dette er kanskje den mest utfordrende steget for kreftceller. Dette er fordi kreftcellene ikke blir forsynt med næring og overlevelsesfaktorer i like stor grad, som var tilfelle i den primære tumoren. Uten disse livsnødvendige faktorene vil de fleste kreftceller dø eller i beste tilfelle overleve som enkeltceller eller i små grupper kalt mikrometastaser. Generelt befinner det seg derfor mange mikrometastaser spredt i kroppen hos en kreftpasient. De kan ligge latent i flere år uten noen aktivitet, men et lite utvalg av disse kan en sjelden gang vokse til et større masse og gi komplikasjoner i form av større tumor metastaser. ¹⁷

Mange av disse stegene kan bli utført av kreftceller gjennom aktivisering av et program kalt epitelial-mesenchymal transition (EMT). Dette brukes normalt tidlig i embryogenesen og til sårtilheling. Dette et kompleks program som kan aktiveres av en rekke signalveier. Vi skal videre i denne artikkelen se på ulike signalveier og

metoder kreftceller benytter seg av til å aktivere EMT eller andre metoder for å metastasere.

For denne oversiktsartikkelen har vi gjort PubMed search med nøkkelordene invasjon metastasis review. Det ga over 6000 treff. Ut i fra disse valgte vi ut 16 artikler.

EMT og MET

Metastase kaskaden er en kompleks, ineffektiv, men dødelig prosess. Ved denne metastase prosessen må tumor celler med epitelial opprinnelse bli invasiv og migrere vekk fra den primære tumoren for spredning gjennom sirkulasjonen og danne sekundære tumorer. Dette utføres via epitelial-mesenchymal transition. EMT er et utviklings program som gir epiteliale celler muligheten til å invadere og migrere som single celler. Dette benytter tumor celler for å oppnå molekylære forandringer som gir tap av epitelial fenotype og utvikle mesenchymal fenotype, noe som tillater celler til å invadere, migrere og metastasere.²

EMT aktiveres gjennom ekstracellulære signalveier som påvirker tumor cellen. Ved tumor celler er det TGF- β , WNT, NOTCH, and growth factor receptor tyrosine kinases som vanligvis induserer EMT i celler. Under EMT aktivering skilles det ut EMT-transkripsjons faktorer som SNAIL, TWIST og ZEB familien. Disse transkripsjons faktorene hemmer transkripsjon av E-cadherin og nedregulerer dannelse av tight junctions, desmosomer, apikal-basal polaritet, noe som er karakteristisk for epiteliale celler. Samtidig blir mesenchymale gener som N-cadherin, fibronectin, vimentin oppregulert. Det blir spesielt økning av proteiner egnet for migrering og invasjon. EMT prosessen kan også reguleres av en rekke signalveier som miRNA, lange ikke-kodende RNA og post-translasjonelle modifikasjoner. Det kan både oppreguleres og nedreguleres avhengig av signalvei og stimuli. Disse reguleringene gjør EMT prosessen veldig kompleks og dynamisk.²

En viktig oppdagelse i studier viser at EMT og mesenchymal epitelial transition (MET) spiller begge viktig rolle i kreft metastase. EMT har vist seg som nevnt over å gi kreftceller evnen til å invadere og spre seg rundt i kroppen. MET er dermed essensielt for at spredte kreftceller skal få evnen til å overleve og kolonisere seg i

metastaserte områder og danne sekundære tumor. Studier har vist at celler ikke nødvendigvis har full MET eller EMT transformasjon, men kan ha en hybrid fenotype mellom MET og EMT, noe som er mer vanlig hos kreftceller. ^{1,2}

Cytoskjeletts reorganisering spiller en sentral rolle for utvikling av en invasiv fenotype hos kreftceller. Hepatocyte growth factor (HGF) har påvirkning på cytoskjeletts sammensetning og reorganisering, og dets rolle i tumor metastase kan spille en viktig rolle for kreftcellers migrering og invasjon. ¹

HGF kommer fra mesenchymale celler og fungerer primært gjennom sitt eneste reseptor, c-Met, på en endokrin eller parakrin metode. En rekke cellulære funksjoner blir aktivert av c-Met/HGF signalering. Disse funksjonene inkluderer embryologisk utvikling, sårtilheling, vevs reparasjon, angiogenese, invasjon og morfologisk differensiering. Noen av disse funksjonene spiller en rolle i tumor metastase, som angiogenese, invasjon og morfologisk differensiering. Disse funksjonene tillater kreftceller til å forlate den primære kreft kolonien og migrere til andre områder for å danne sekundære kolonier. En viktig aspekt i denne bevegelsen er reorganisering av cytoskjelettet. Cytoskjelettet består av mikrofilamenter, intermediate filamenter, mikrotubuli og proteiner som kobler celler til deres ekstracellulære matriks. I tillegg til disse strukturene er det en rekke signalveier for regulering av cytoskjelettet som benyttes under tumor metastaser. ¹

HGF og mikrofilamenter

Mikrofilamenter består av aktin og aktin bindende proteiner. Kreft celler er karakterisert av deres dynamiske reorganisering av aktin cytoskjelettet, noe som er essensielt for utvikling fra epitelial fenotype celler til mesenchymal fenotype celler. Ved HGF-regulering blir aktin cytoskjelettet regulert av Rho familien gjennom små GTPaser, hvor ulike kreft celler benytter ulike GTPase signalveier til regulering av cytoskjelettet for å utvikle evnen til migrering, invasjon og metastasering. ¹

HGF og mikrotubuli

Mikrotubuli spiller en rolle ved segregering av kromosomer under mitosen. Mikrotubulis rolle i kreftmigrasjon er dets rolle i kreftcelle protrusjon dannelse og

EMT. Dynamisk vekst av mikrotubuli har vist å medføre celle migrering og protrusjon. HGF/c-Met aktiverer en rekke signalveier, inkludert EBE1 og +TIPs rekrutering til mikrotubuli-ender, tankyase og stathmine-mediert stabilisering av MT. EBE1 er også en regulator av aktin filamenter og kan dermed regulere kreft migrering gjennom mikrotubuli og mikrofilamenter. ¹

HGF og celle-celle kontakter

Den viktigste mekanismen i HGF-regulert kreft spredning ved celle-celle kontakter er gjennom fosforylering av cellekontakt molekyler og deres interaksjonsmolekyler. Fosforylerte kontaktceller blir ustabile ved kontaktpunktene og mister sine evner til å opprettholde celle-celle kontakter. Løsning av disse kontaktene medfører at kreft celler får mulighet til å invadere og migrere. Dette skjer gjennom en rekke signalveier induert av HGF/c-Met. I tillegg inducerer HGF adhesjon protein ustabilitet gjennom dispersjon av aktin filamenter i kontaktområdene. HGF er også med på å regulere integrin nivåer ved fokale adhesjoner. Integriner regulerer ekspresjon av gener for migrasjon. FAK og paxillin er fosforylert gjennom HGF behandling, dette resulterer i dynamiske forandringer i fokale adhesjoner, noe som er viktig ved kreft celle motilitet. ¹

CD44

CD44 er en overflate reseptor i både kroppens normale celler og kreftceller, som spiller en rolle i reguleringen av metastase Dens interaksjon med ekstracellulær matriks komponenter medfører migrasjon og invasjon i kreft metastase prosessen. Utenom vanlig CD44 reseptor har det også blitt vist at kreftceller danner CD44 isoformer ved hjelp av variert mRNA-spleising. Ved å legge flere exoner ved den ekstracellulære domenen nær transmembranen til standard CD44 viser å øke sjansen for å danne større isoformer av CD44. Noen av disse isoformene har vist å ha tilknytning til kreft progresjon og metastaser. Derfor kan ekspresjon av disse isoformene spille en rolle som markører for ulike krefttyper og kreft stamceller. Nylige studier har vist at CD44 intracellulær domene også har relasjon til metastaser ved bryst kreft. ³

CD44 består av en ekstracellulær, transmembran og intracellulær domene. Denne

reseptoren eksisterer i en rekke av kroppens celler med sin isoform type, men isoform typen er langt mer sjeldnere. CD44 har som funksjon å regulere hyaluronan metabolismen, tilheling og keratinocyt proliferasjon. CD44 binder en rekke ligander som hyaluronan (HA), osteopontin (OPN), kollagener og matriks metalloproteinaser (MMP). Aktivisering av CD44 viser å føre til endring av cytoskjelettet gjennom aktinbindende proteiner som igjen gir mulighet for invasjon og motilitet. Deling av reseptoren kan medføre at CD44 intracellulær domene vandrer til cellekjernen for å så stimulere til transkripsjon av en rekke proteiner som kan gi økt celle overlevelse og kreft invasjon.³

OPN har vist å spille en rolle i høy invasive kreftmetastaser i mennesker i følge flere studier. Prostata kreft vekst og progresjon påvirkes av parakrin og autokrin signalering av OPN. CD44-OPN interaksjon induserer celle migrasjon fra sirkulasjonen til inflammerte områder. OPN binding til CD44 viste økt celle motilitet, spredning og kjemotakse i rotte kreft i en studie.³

MMP er en viktig ekstracellulær matriks protein involvert i degradering av ekstracellulær matriks. Den spiller en viktig rolle i utvikling, tilheling, ben resorpsjon og angiogenese. Det har blitt vist at MMP-9 binding til CD44 øker kreft invasjon i noen krefttyper.³

Studier har vist at CD44 aktivisering spiller en rolle i aktivisering av angiogenese i en rekke krefttyper. Dette hjelper kreft metastaser med kolonisering. CD44 isoformer har i studier også vist å ha bindings domener for en rekke vekstfaktorer som VEGF, heparin-bindende fibroblast vekstfaktor og heparin-bindende endotel vekstfaktor. Nylige studier indikerer at CD44 også spiller en rolle i ben metastaser. Dette foregår gjennom HA binding. HA-CD44 binding gir kreftceller evnen til å metastasere i ben ved å gi økt invasjon og migrasjon potensiale. CD44 kan også spille en rolle i regulering av proteiner som er involvering i osteoklast differensiering og tumor metastase.³

Eksosomer

Eksosomer er små membran vesikler som kan fungere som funksjonelle mediatorer i

celle interaksjoner som medfører kreft metastase. Eksosomer påvirker kreftcelle invasjon, overlevelse i blodsirkulasjon, feste til og kolonisering i nytt vev. De inneholder proteiner fra cellemembran og cytosol. De brukes til kommunikasjon og signalering mellom kreftceller, og er ikke avhengig av celle kontakt. De inneholder også lipider, mRNA, microRNA og DNA som gir evnen til å dele genetisk informasjon mellom celler. Eksosomer tas opp av naboceller gjennom endocytose, receptor-ligand interaksjoner eller direkte opptak i membranen gjennom fusjonering. ⁴

I kreft blir kommunikasjon gjennom eksosomer brukt til å fremme migrasjon, resistens mot behandling og metastase. Studier har vist at eksosomer har en viktig rolle i EMT. Dette skjer hovedsakelig av at eksosomer brukes av kreftceller til å aktivere Snail, Twist eller Zeb signalveier som igjen medfører at celler inngår i EMT. Eksosomer fra normale vev har ikke denne EMT stimulerende effekten i følge noen studier, men kun eksosomer fra tumorvev har EMT induserende og migrerende effekt. Spesielt ulike microRNA i eksosomer brukes til å aktivere ulike signalveier i kreftceller som fører til økt kreftutvikling, migrering og metastase. Det finnes utallige microRNA i slik signalering, disse kan ha både onkogen og tumorsuppressiv effekt. Eksosomer er ikke bare i stand til å gi kreftceller en mesenchymal fenotype gjennom EMT, men de har også egenskapen til å omdanne mesenchymale stamceller til kreft assosierte fibroblaster (CAFs). CAFs kan så igjen stimulere til EMT og kreft migrering gjennom egne eksosomer. Disse kreft assosierte fibroblastene kan også gi økt evne til invasjon av tumorer ved at de danner kanaler gjennom den ekstracellulære membranen med enzymet MMP13. Det har også blitt bevist at disse fibroblastene invaderer sammen med tumor celler og metastaser til andre områder. ⁴

Før og etter metastasering er det viktig for små tumor kolonier å få nok næring og oksygen tilførsel. Dette utføres ved å aktivere angiogenese gjennom eksosomer. Dette induseres både av parakrine signal molekyler og mRNA i utskilte eksosomer. Det er viktig i denne fasen å kunne rekruttere endoteliale forløper celler for å gi mulighet til celle progresjon for dannelse av nye kar. Tumor deriverte eksosomer(TDE) blir distribuert til metastase områder gjennom integriner. Etter å ha kommet til angitte metastase områder medfører TDE til dannelse av en premetastase niche i det bestemte området ved å rekruttere bein marg forløper celler. Gjennom disse cellene vil TDE danne en metastase niche hvor tumor celler kan kolonisere og skape organspesifikke

metastaser. Eksosomer brukes også til å skape en kobling til blodplater for beskyttelse i blodsirkulasjon og for å uskadeliggjøre NK celler i sirkulasjonen. Dette gir kreftcellene en større sjanse for å overleve det ugunstige tilværelset i sirkulasjonen. Videre i den premetastase nichen hemmes immunsystemet igjen av eksosomer fra kreftceller, dette er for å fremme celle proliferasjon og kolonisering. TDE stimulerer også til en fordelaktig inflammasjon i koloniområdene med angiogenese for å stimulere til tumor vekst og videre metastase. ⁴

Invadosomer

Invadopodia og podosomer er aktin baserte molekulære fremspring i kreftceller og vanlige celler. Disse fremspringene dannes som et resultat av avanserte signalveier, forandring i mikromiljø og ekstracellulær matriks stimuli. De er komplekse molekulære strukturer dannet av en kompakt aktinfilament kjerne bestående av aktin regulerende proteiner som polymeriserings aktivatorer, filament bindere og andre proteiner involvert i regulering, adhesjon og struktur. De viktigste proteinene er Tks5, N-WASP og MT1-MMP. Disse hjelper vanlige celler og tumor celler til å degradere og invadere gjennom proteolytisk aktivitet. Invadopodia og podosomer er veldig like i funksjon med tilnærmet lik struktur, men studier har vist forskjeller mellom dem. Siden de begge spiller rolle i migrering og invasjon av celler nevnes de som invadosomer her. ^{5,6}

Til tross for at de deltar i mange ulike cellulære prosesser, deler de en singel hovedfunksjon som kontrollerer pericellulære proteolytiske aktiviteter, dette skiller invadosomer fra andre aktin baserte strukturer som filopodia, lamellipodia og fokale adhesjoner. Studier har vist at podosomer og invadopodia har rolle i dannelsen av ulike strukturer i kroppen under embryogenesen og postnatal utvikling. De har også gjennom studier vist å spille en rolle i prosesser som angiogenese, vaskularisering og tilheling. I noen studier som fokuserte på om invadosomer hadde en tilknytning til tumor metastase ble det funnet at hemming av N-WASP, som er en essensiell del av invadosomer, resulterte i redusert tumor metastase og kreftcelle migrering i sirkulasjonen. En annen studie viste at celler med Tks5 invadopodia beveget seg fra en primær tumor. Det har også blitt vist at invadosomer også kan spille en rolle for ekstravasasjons prosessen i tumor metastase. Det er gjort en rekke studier for å se om

invadosomer har rolle i alle de ulike fasene av kreft metastase, og selv om det ikke er blitt funnet helt konkrete bevis på sammenheng i alle faser kan det tenkes at invadosomer påvirker hver fase.^{5,6}

Kreftcellene har høyt forbruk av oksygen, noe som fører til at det blir hypoksi i micromiljøet rundt kreftcellen. Hypoksi vil så kunne stimulere til ytterligere tumorvekst og metastase. Dette skjer ved at dannelsen av invadopodium i kreftcellen øker og cellen vil så bryte ned ECM og prøve å få seg til ett bedre micromiljø. Proteolytiske prosessen til invadopodium blir brukt til å trenge gjennom basalmembranen til blodårer og dermed inngå i intravasasjon prosessen. Etter å ha overlevd spredning gjennom sirkulasjonen brukes invadosom proteasene igjen til ekstravasasjons prosessen ut av sirkulasjonen. Videre blir igjen invadosomer brukt til å invadere metastase områder for dannelse av nye kolonier. For kolonisering er det viktig at kreftceller gjennomgår en MET prosess og at det stimuleres til angiogenese. Denne prosessen kan tenkes å innebære invadosomer, men konkret bevis på dette er ikke enda funnet.^{5,6}

Makrofager

Makrofager er blant de vanligste immuncellene i kreft mikromiljøet og har ofte motvirkende effekt mot kreft, men de kan også være med på å stimulere til kreftutvikling. De er tilstede i alle fasene i kreftutvikling og stimulerer til angiogenese, tumor celle invasjon og intravasasjon i det primære området. I det metastaserende området er makrofager og monocytter tilstede for å ta imot migrerende kreftceller og stimulerer til ekstravasasjon og overlevelse ved å hemme immunforsvaret eller utvikle resistens i kreftceller. I tillegg er de med på å skape et godt metastaserende miljø for andre migrerende kreftceller. Rikelige tall av makrofager i tumorer er beregnet å indikere dårlig prognose, det samme gjelder store mengder makrofag rekrutterende kjemokiner som CSF-1. Makrofager som medfører til tumor vekst og spiller en fordelaktig rolle for kreftutvikling kalles for tumor assosierte makrofager. Det er hovedsakelig disse som stimulerer til kreft progresjon og hemmer immunresponsen mot kreft. Makrofager har i hovedsak ulike fenotyper avhengig av mikromiljø og tilvenner seg til forandringer i mikromiljøet. Tumor assosierte makrofager er en fenotype som dannes av immunsupprimerende cytokiner

som IL-4, IL-10 og IL-13 som skilles aktivt ut av celler i tumor mikromiljøet. ⁷

Tumor assosierte makrofager(TAM) har i studier vist å stimulere til kreft progresjon og hemming av apoptose gjennom sine signalstoffer. Blant de viktigste funksjonene er stimulering av angiogenese, dette er essensielt for at kreftceller skal overleve og vokse. Makrofager har vist også å gi kjemoresistens gjennom en rekke signalstoffer. Dette kan ha stor effekt på prognosen til ulike stadier i kreft. Makrofagers funksjon utføres ved hjelp av CSF-1 som skilles ut av kreftceller, dette igjen medfører at makrofager skiller ut vekstfaktorer som fører til migrering av makrofager etterfulgt av kreftceller. Intravasasjon og ekstravasasjon utføres også ved hjelp av makrofager ved at VEGF-A skylls ut, noe som hjelper spredte kreftceller til å både komme inn og ut av sirkulasjonen. Makrofager er også med på å spille en rolle som retinerende faktor for spredte kreftceller som utgår fra sirkulasjonen og medfører økt antall kreftceller i metastase områder. Videre hjelper makrofager kreftcellene gjennom direkte og indirekte celle-celle kontakter med å danne et gunstig miljø for kolonisering av nye tumorer. ⁷

MicroRNA

MicroRNA er små RNA molekyler som spiller en viktig rolle i den post transkripsjonelle reguleringen av gener og påvirker utviklingen, differensieringen, proliferasjonen, apoptose av celler og dannelse og progresjon av kreft. Flere studier har vist at microRNA molekyler induserer eller inhiberer den epitheliale mesenchymale transformasjonen (EMT). Dette foregår gjennom en rekke ulike mekanismer og signalveier som regulerer EMT i kreft celler. ⁸

MicroRNA inhiberer translasjon av gener eller degraderer mRNA gjennom spesifikke baseparing til mRNA for bestemte gener. På denne måten regulerer microRNA den posttranskripsjonelle gen ekspresjonen og videre utvikling og vekst av kroppen og dens celler. Nylige studier har vist at microRNA regulering av mRNA kan føre til celle proliferasjon, redusert celle apoptose, økt celle invasjon og medføre til utvikling og progresjon av kreft. Hovedsakelig skjer dette ved at ulike microRNA induserer eller hemmer ekspresjon av gener som videre regulerer EMT i celler og gir celler evnen til å invadere og migrere eller motsatt. På denne måten har microRNA

funksjonen til onkogener eller tumorsuppressorgener avhengig av hvordan den regulerer EMT prosessen i kreft celler. Flere studier har vist at en rekke microRNA er med på å indusere til kreft invasjon og spredning. Eksempler på slike microRNA er miR-10b, miR-21, miR-155, miR-9 og mange andre. ⁸

Disse microRNAene fører til økt kreft metastasering ved å enten stimulere signalveier som gir økt EMT i kreftceller eller ved å hemme signalveier som hindrer EMT i kreftceller. Samtidig har vi miRNA som fungerer mer som tumorsuppressorgener og hemmer kreft utvikling eller spredning. Eksempler på slike miRNA er miR-200 familien, miR-34 familien og SMAD7. Disse har i ulike studier vist lavt aktivitet i kreftceller. Stimulering av disse har medført en reduksjon av EMT, kreftutvikling og spredning. MiR-200 familien har vist å hemme ZEB1 og ZEB2 og derfor oppregulere E-cadherin ekspresjon. E-cadherin er typisk i epiteliale celler og ekspresjon av dette vil hemme EMT og stoppe spredning av kreftceller. ⁸

Mikromiljøet rundt kreftcellene

Tumorer er omringet av ekstracellulær matriks og stroma celler. Den fysiske tilstanden til mikromiljøet i tumoren spiller en viktig rolle i alle stegene for karsinogenesen. Studier har vist at de essensielle komponentene i tumor mikromiljøet er fibroblaster, myofibroblaster, neuroendocrine celler, fettceller, immunceller, blod og lymfatisk nettverk og ekstracellulær matriks. Det er vist at friske mikromiljøer kan ha tendens til å motstå malignitet, mens syke mikromiljøer heller er en medvirkende faktor til malignitet. ⁹

Fibroblaster i kreftutviklingen

Aktiverte fibroblaster med en myofibroblast fenotype i kreftskader gjenkjennes som kreft assosierte fibroblaster (CAF). Disse fibroblastene skiller seg fra andre fibroblaster ved at de vil være i en konstant aktivert fase i tumor miljø. Dette medfører at fibroblastene virker inn på flere molekylære signalveier og gir økt svulst dannelse. Dette foregår gjennom remodelering av ekstracellulær matriske (ECM), induksjon av angiogenese, rekruttering av inflammatoriske celler og direkte stimulering av kreft progresjon ved sekresjon av vekstfaktorer, immunsuppressive cytokiner og mesenchymal-epitelial celle interaksjoner. ⁹

Immun- og inflammatoriske celler i kreftutvikling

Immunforsvaret består av en rekke celler som skal beskytte kroppens vev mot invaderende og infeksiøse patogener og fjerne skadete celler. Studier har vist at cellene i immunforsvaret kan spille en rolle for kreftutvikling og progresjon. En metode er at immun miljøet kan påvirke tumorer til å utvikle raske og resistente celler for kreftutvikling og invasjon. Siden de trege kreftcellene blir tatt av immunsystemet vil utviklingen av den primære tumoren hovedsakelig bestå av det utvalgte tumorceller som har best kompetanse til å invadere og spre seg til andre vev. Andre studier har vist at immunceller kan redusere antikreft proteiner og cytokiner, og slik medføre til økt kreft invasjon.⁹

Det har også blitt vist at flere granulocytter kan gjennom utskillelse av bestemte cytokiner som HGF eller G-CSF stimulere til kreft utvikling. Det har også blitt vist at noen immunceller har en immunsuppressiv effekt, den vanligste er Treg cellene.⁹

Angiogenese

Blod og lymfatisk system i kreftvev forsyner miljøet med oksygen og næring samtidig som karbondioksid og avfallsmaterialer blir fjernet. Angiogenese vil alltid være stimulert av den grunn for dannelse av nye kar for vedlikehold og vekst av tumoren, siden kreftceller ofte må vokse i vanskelige hypoksiske mikromiljøer. Samtidig er blod og lymfatisk system med på svekke immuncellers funksjon mot kreftceller, enten ved å inhibere dem gjennom myloid deriverte suppressive celler og umodne dendritiske celler i den sentrale lymfeknuten eller ved å skille immunceller vekk. Denne vaskulariseringen kan også benyttes av kreftceller til å migrere til andre vev. Ca²⁺ i kreftcellene er også med på å regulere utskillelse av andre molekyler. Eksempel på ett slikt molekyl er VEGF som er viktig stimulator av endotelceller og setter i gang angiogenese.^{9,10}

Fettvev og kreft har blitt vist å ha en relasjon. Det har blitt vist at hypoksiske fettvev har høyere sjans for å utvikle tumorvev på grunn av det utfordrende miljøet. Samt skilles det ut en rekke cytokiner, kjemokiner og hormonelle faktorer fra fettceller som kan initiere kreft ved å oppregulere fedme. Det finnes også et høyere antall makrofager og monocytter i fettvev hos fedme pasienter, noe som kan også gi økt sjans for tumorutvikling lokalt. Høye nivåer av østrogen i blodet kan gi kronisk

lavgradige inflammasjoner som kan være medvirkende faktor for utvikling av kreft. Fett stamceller kan også ved å endre tumor mikromiljøet, stimulere til angiogenese, differensiere til kreft stimulerende celler og inducere EMT, spille en essensiell rolle i tumorutvikling og vekst. ⁹

Neuroendokrine celler er nerveceller som sirkulerer i blodet. De har både endokrine og nevrogene preg. Studier har vist at disse kan påvirke immunceller gjennom neurotransmittere. De kan både hemme den cytotoxiske effekten til bestemte immunceller og føre til økt migrering. Andre sekresjonsprodukter kan medføre til kreft progresjon og økt aggressiv vekst. ⁹

O-glykaner

Proteiner som kan O-glykosyleres er blant annet: enzymer, transkripsjonsfaktorer, reseptorer og strukturelle proteiner er regulert eller modifisert av O-glykosylering. Dette er en post transkripsjonell prosess.

O-glykosylering kan beskytte disse proteinene mot proteolytisk degradering, men muliggjør også rekognisjon, adhesjon og andre celle-celle kommunikasjonsfunksjoner. Slike endringer i glykosylering av proteiner fører enten til tap eller forandring i karbohydrat strukturer på proteinet.

Viktige proteiner som er O-glykosylerte:

- CD44 bidrar til metastase ved å binde seg til endothelial E-selectin.
- Tn antigen som er O-glykosylert og assosiert med flere typer kreft og viser høy metastatisk potensiale samt dårligere prognose. Dannes som oftest sammen med Tn og promoterer tumorvekst og metastase.
- Muciner er høyt glykosylerte proteiner som leder til tumorvekst, migrasjon og invasjon.
- Integriner er O-glykosylerte proteiner som påvirker binding av tumorceller til ECM og celle-celle interaksjoner.
- Andre proteiner hjelper til metastasen ved at de glykosylerte proteinene fører til celle-celle rekognisjon, celle adhesjon og motilitet. ¹¹

N-glycaner

N-glykosylering skjer hovedsakelig på membran bundne eller sekreterte proteiner. Glykosylering av adhesjons proteiner kan påvirke deres bindingsevner, som igjen kan lede til endrede celle-celle eller celle-matrix kontakter og bidrar til EMT. N-glykosylering av E-cadherin har stor rolle på proteinets funksjon som adhesjons molekyl, signaliseringsmolekyl og tumor suppressor. Slik forandring setter i gang flere reaksjoner i cellen som påvirker proteinet, som igjen virker på signaliserings veier, som resulterer i EMT, invasjon og metastase. CD44 blir N-glykosylert noe som har stor innvirkning på tumorcellens migrasjonsevne. Matrix metalloproteinaser er viktige proteolytiske enzymer som degraderer ECM. Disse har flere N-glykosyleringssteder i deres katalytiske domene, som påvirker deres funksjon.¹¹

Glycosaminoglykaner (GAGs)

Glycosaminoglykaner binder seg hovedsakelig til proteoglykaner, disse proteinene kan også være O- eller N-glykosylert mer eller mindre i tillegg, men glycosaminoglykaner spiller viktigere rolle for proteinets funksjon.

6 ulike hovedvarianter: hyaluronan(HA), chondroitin sulfat (CS), dermatan sulfat (DS) heparin og heparan sulfat (HS) og keratan sulfat.¹¹

Det at CS blir sulfatert påvirker deres biologiske funksjon og er en viktig faktor i videre tumor progresjon. Tumorcelle assosierte CS ser ut til å promotere migrasjon og invasjon. CS fragmenter i ECM er også med på å øke tumorcellenes motilitet via påvirkning av CD44 felling. Tumorceller vil også ha slike proteoglykaner som membranproteiner som tar tak i bindingsproteiner på aktiverte blodplater eller endotheliale celler og slik fører til extravasasjon.¹¹

HS er lokalisert på celle overflaten eller i ECM og modulerer celle-celle eller celle-ECM interaksjoner. Kan fungere som inhibitor eller promotor av tumorvekst.

HA er hovedsakelig bundet til deres spesifikke reseptorer eller i ECM der de modulerer celle mikromiljøet. HA kan interagere med deres reseptorer for eksempel CD44 og fungere som signal mediator, som er viktig for tumor progresjon. Ved at HA bindes til CD44 fasiliteres migrasjon og invasjon av tumor celler. HS proteaser som for eksempel heparanase kutter HS kjeder i basalmembranen, i underliggende ECM og på celle overflaten, og er en potent tumor promotor. Hoved konsekvensene av heparanase aktivitet er at det fører til utskillelse av vekstfaktorer, cytokiner, og remodellerer ECM, som igjen fører til promotering av invasjon og metastase.¹¹

Notch, Wnt og Hedgehog

Notch, Wnt og Hedgehog er viktige vekst reaksjonsveier som fungerer som signalsystemer som påvirker og kontrollerer proliferasjon, celledød, motilitet og migrasjon. Disse reaksjonsveiene aktiveres i primære krefttumorer der de driver eller bidrar til kreft initiasjon, men også utvikling av metastaser.^{12, 16}

I mange tilfeller er Notch en onkogen som er assosiert med flere ulike sider ved kreft, blant annet tumor progresjon til metastasering, anoikis resistanse, EMT, neoangiogenese, malign celleproliferasjon og endringer i miljøet i det nye vevet slik at det blir mer vennlig mot de nye cancer cellene. Kan også fungere som tumor suppressor.^{12, 16}

Det viser seg at Wnt/B-Catenin er kritisk for kreftutvikling, angiogenese, migrasjon og invasjon. Man har også sett at antagonistene til Wnt også øker tumor og metastase prosesser.^{12, 16}

Hedgehog er involvert i celledifferensiering, men også i fysiologisk og tumorigent kontroll av cellulære aspekter som proliferasjon, celledød, motilitet, migrasjon og invasjon.^{12, 16}

Resistanse mot anoikis

Anoikis er en type programmert celledød, som aktiveres når celler løsner det omgivende epetheliale vevet eller ekstracellulær matrix. For at kreftcellene skal overleve og kunne metastasere settes ulike molekulære mekanismer i gang slik at de unngår slik celledød. Man har sett at integrin utviklings reaksjonsveier er en slik type mekanisme som får cellen til å unngå apoptose. Denne type reaksjonsvei fører til dannelse av spesifikke proteiner som hindrer mitokondriet i å sette i gang apoptosen. Integriner har også muligheten til å sette i gang prosess der cellen unngår anoikis ved at utviklingssignalmolekyler aktiveres uavhengig ligand.¹²

Neoangiogenese

Neoangiogenese er angiogenese som settes i gang av tumorgenese. Hensikten med dette er å sette i gang en prosess som danner flere blodårer i tumorvevet slik at tumorcellene får den næringen og oksygenet de trenger. En annen funksjon disse nye

blodårene har er at de gir tumorcellene enklere tilgang til blodomløpet slik at cellene kan metastasere. Enklere med tanke på at distansen til nærmeste blodåre blir vesentlig kortere. Hoved aktivatoren i en slik angiogenetisk prosess er hypoksisk mikromiljø. Det hypoksiske mikromiljøet setter i gang reaksjonsveier som får cellene til å aktivere angiogenetiske gener som igjen danner proteiner som fører til nydannelse av blodårer i tumorvevet. ¹²

Ca²⁺

Ca²⁺ er ett ion og fungerer som ett intracellulært signalmolekyl, som er med på å regulere cellulære prosesser, dette gjør kreftceller også. Kreftceller bruker dette molekylet i mange ulike prosesser, blant disse finner vi blant annet prosesser innenfor metastase av kreftcellene. Man har sett at Ca²⁺ er på å regulere EMT, celle migrasjon, lokal invasjon og induksjon av angiogenese. ¹⁰

Ca²⁺ konsentrasjonen intracellulært vil enten stimulere eller inhibere signalet. Høy intracellulær Ca²⁺ konsentrasjon stimulerer, mens lav konsentrasjon gir inhibisjon. Ca²⁺ konsentrasjonen intracellulært regulerer ved inntak av Ca²⁺ via cellemembran kanaler eller at organeller som for eksempel endoplastisk retikulum(ER) slipper ut Ca²⁺. For å senke konsentrasjonen aktiveres ATPaser som pumper Ca²⁺ ut av cellen eller inn i ER. ¹⁰

I flere krefttyper ses det at intracellulære Ca²⁺ konsentrasjonen er en viktig regulator av EMT. Kreftcellene vil senke Ca²⁺ konsentrasjonen i cellen ved å deregulere Ca²⁺ ionekanaler i cellemembranen, slik at mindre Ca²⁺ ikke tas inn i like stor grad. Dette er en viktig regulator av EMT ved carcinogenese. ¹⁰

Celle migrasjon er en kompleks aktivitet som koordinerer remodellering av celleskjelettet, celle-substrat adhesjon/løsrivelse og cellens protrusjon og kontraksjon slik at cellen får beveget på seg. Ca²⁺ påvirker og styrer mange av celle migrasjonens komponenter, eks på dette er kontraksjon av cellen som styres av Ca²⁺ avhengige proteiner og det styrer også cellens adhesjon/løsrivelse med andre substrater i ECM. ¹⁰

Kreftcellene har evnen til å danne invadopodia som hjelper kreftcellen i å bevege seg. Invadopodias formasjonsprosess deles inn i initiasjon, montering og modning. I denne formasjons prosessen har man sett at Ca^{2+} er en viktig predisponerende faktor samt at det også er viktig for deres aktivitet. ¹⁰

Ca^{2+} i kreftcellene er også med på å regulere utskillelse av andre molekyler. Eksempel på ett slikt molekyl er VEGF som er viktig stimulator av endotelceller og setter i gang angiogenese. ¹⁰

Kreftcellenes invasjon modus

Kreftceller kan migrere enten alene ved at de kvitter seg med cell-cell junctions, eller samlet sett ved at cell-cell junctions beholdes. Kreftcellene har da ulike strategier for migrasjon individuelt eller i samhold Samlet kan de migrere i lymfen, mens enkelt celler kan migrere i blodomløpet. ¹³

Multicellulær streaming handler om at cellene går samme vei gjennom vevet. Dette skjer ved at ECM guider disse cellene ved hjelp av blant annet kjemokiner. Det fører til koordinert migrasjon av cellene. Ved slik migrasjon migrerer cellene gruppevis ved at enhver sitt cytoskjelett jobber og drar alle fremover, samtidig som de har svake adhesjons bindinger til hverandre. ¹³

Kollektiv invasjon handler om at gruppe celler skiller seg fra primære tumoren og vandrer ut i ECM. Cellene kan da endre morfologi ut i fra hvor mange de er, hva slags vev de penetrerer osv. Gruppen har en eller flere lederceller med mesenchymal karakter og beveger gruppen fremover. ¹³

Cellene kan også begynne i gruppe med kollektiv invasjon og etter en stund begynne å gå fra gruppen og metastasere alene. ¹³

Konklusjon

Den komplekse naturen i kreftspredning trenger mye nærmere forskning. Denne prosessen er som vist av de få studiene i denne artikkelen veldig dynamisk og kompleks. Alle signalveiene og faktorene som spiller en stor eller mindre rolle i kreftspredning danner sammen et langt større system enn det som har blitt antatt før. Det kreves ytterligere forskning om dette emnet både for å forstå denne prosessen i

mer dybde og for å kunne danne et grunnlag for effektiv behandling mot kreft i fremtiden.

Litteraturliste

¹ HGF/Met Signaling in Cancer Invasion: The Impact on Cytoskeleton Remodeling. Xiang C1, Chen J2, Fu P3,4. Trends Cell Biol.

2017 Apr 12. pii: S0962-8924(17)30044-2. doi: 10.1016/j.tcb.2017.03.003. [Epub ahead of print]

² Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis.

Yeung KT1,2,3, Yang J1,3,4. J Pathol.

2017 Apr;241(5):567-577. doi: 10.1002/path.4871. Epub 2017 Mar 7.

³ CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells.

Senbanjo LT1, Chellaiah MA1. Semin Cancer Biol.

2017 Mar 16. pii: S1044-579X(17)30040-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.03.002.

[Epub ahead of print]

⁴ The Role of Exosomes in Cancer Metastasis.

Steinbichler TB1, Dudás J1, Riechelmann H1, Skvortsova II2 Mediators Inflamm.

2017;2017:9624760. doi: 10.1155/2017/9624760. Epub 2017 Jan 22.

⁵ Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. Eddy

RJ1, Weidmann MD1, Sharma VP2, Condeelis JS Mol Cancer.

2017 Apr 11;16(1):76. doi: 10.1186/s12943-017-0646-3.

⁶ Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. Paterson EK1, Courtneidge SA1,2,3. Cancers (Basel).

2017 May 5;9(5). pii: E44. doi: 10.3390/cancers9050044.

⁷ Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. Nielsen SR1, Schmid MC Mol Oncol.

2017 Jan;11(1):5-27. doi: 10.1002/1878-0261.12019. Epub 2016 Dec 9.

⁸ MicroRNAs regulate the epithelial-mesenchymal transition and influence breast cancer invasion and metastasis.

Zhao M1, Ang L1, Huang J1, Wang J Semin Cancer Biol.

2017 Feb 12. pii: S1044-579X(17)30024-X. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.02.006.

[Epub ahead of print]

⁹ Role of tumor microenvironment in tumorigenesis.

Wang M1, Zhao J2, Zhang L2, Wei F2, Lian Y2, Wu Y2, Gong Z2, Zhang S3, Zhou J4, Cao K4, Li X4, Xiong W5, Li G5, Zeng Z5, Guo C5. Front Cell Dev Biol.

2017 Mar 7;5:18. doi: 10.3389/fcell.2017.00018. eCollection 2017.

¹⁰ Molecular mechanisms of tumour invasion: regulation by calcium signals.

Iamshanova O1, Fiorio Pla A1,2, Prevarskaya N1 Tumour Biol.

2017 Feb;39(2):1010428317691682. doi: 10.1177/1010428317691682.

¹¹ Role of protein glycosylation in cancer metastasis.

Oliveira-Ferrer L1, Legler K2, Milde-Langosch K2 J Physiol.

2017 May 15;595(10):3063-3075. doi: 10.1113/JP272844. Epub 2017 Apr 21.

¹² Developmental pathways associated with cancer metastasis: Notch, Wnt, and Hedgehog.

Nwabo Kamdje AH1, Takam Kamga P1, Tagne Simo R1, Vecchio L1, Seke Etet

PF1, Muller JM1, Bassi G1, Lukong E1, Kumar Goel R1, Mbo Amvene J1, Krampera M1. Mol Oncol.

2017 Jun 7. doi: 10.1002/1878-0261.12091. [Epub ahead of print]

¹³ Modes of invasion during tumour dissemination.

Pandya P1, Orgaz JL1, Sanz-Moreno V Mol Oncol.

2017 Jan;11(1):28-39. doi: 10.1002/1878-0261.12017. Epub 2016 Dec 9.

¹⁴ Revisiting the hallmarks of cancer.

Fouad YA1, Aanei C2. FEBS J.

2017 May 26. doi: 10.1111/febs.14123. [Epub ahead of print]

¹⁵ EMT: Present and future in clinical oncology.

Santamaria PG1, Moreno-Bueno G1,2, Portillo F1, Cano A1. Am J Cancer Res.

2017 May 1;7(5):1016-1036. eCollection 2017.

¹⁶ EMT: Present and future in clinical oncology.

Santamaria PG1, Moreno-Bueno G1,2, Portillo F1, Cano A1. Am J Cancer Res.

Cancer Biol Med.

2017 May;14(2):109-120. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0032.

¹⁷ The Biology of Cancer.

Robert A. Weinberg.

2nd edition