

# **Molekylære mekanismer ved spredning av kreft**

**Farwa Abbas og Hiba Al-Rubaye**



**Odontologiske fakultet  
UNIVERSITET I OSLO**

**Veileder: professor Magne Bryne**

## Innholdsfortegnelse

---

<b>Forord</b>	2
<b>Kreftcellenes metastaseringssevne</b>	3
<b>EMT</b>	3
TGF- $\beta$	5
WNT og Notch	6
Transkripsjonsfaktorene	6
Mellomstadier av E/M stadier	7
Hemming av EMT	7
<b>Invasjon</b>	8
Cellemotilitet	8
Invasjonsmåter	9
Kollektiv cellemigrasjon	9
<b>Intravasasjon</b>	10
Angiogenese	11
<b>Ekstravasasjon og kolonisering</b>	12
MET	12
<b>Andre molekyler med en viktig rolle i tumorprogresjon</b>	13
Matriks metalloproteinaseres rolle i tumor progresjon	13
Notch, Wnt og hedgehog	16
<b>Immunsystemets rolle i kreft</b>	17
Makrofager	18
Nøytrofile granulocytter	19
Natural killer celler	20
Dendrittiske celler	20
T-celler	21
B-celler	22
<b>Konklusjon</b>	24
<b>Litteraturliste</b>	25

## **Forord**

Kreft, ondartet neoplasi, er en gruppe sykdommer som skyldes ukontrollert vekst av celler. Det som hovedsakelig skiller kreft fra benigne svulster er at den har evne til å infiltrere andre vev og spre seg til flere andre steder i kroppen. Det var 33 564 antall nye kreft tilfeller i Norge i 2017 (1).

Statistikken viser også at i 2016 døde ca. 11 000 mennesker som følge av kreft i Norge (1). Dette gjør kreft til et veldig interessant og viktig forskningstema. Kreft kan være en dødelig sykdom. Det er først og fremst når man får metastaser at prognosen blir betraktelig mye dårligere. Det er derfor satt søkelys på metastaseringsprosessen.

De siste årene har forskning på kreft vært i fokus, men en konkret kur eller behandling av kreft er fremdeles ikke tilgjengelig. Dette skyldes til dels at man ikke med sikkerhet kan si hvorfor akkurat et individ får kreft. Selv om f.eks. røyking en viktig risikofaktor for å få kreft, kan vi likevel ikke med sikkerhet si at en storrøyker vil få kreft. Kreft er en multifaktoriell sykdom.

En annen årsak til at det er vanskelig å finne en konkret behandling er at kreftceller vokser og sprer seg ved hjelp av mange ulike mekanismer. Spesielt metastaseringsprosessen av kreft er kompleks og involverer mange ulike steg. Det å hemme en eller få av disse stegene vil ikke alene kunne forhindre spredningen. Derfor er det stor fokus på forskning på denne spredningsprosessen.

I denne oppgaven har vi fokusert på metastaseringsprosessen og tatt for oss nyere forskning innenfor dette feltet. Vi har forsøkt å lage en oversikt over de mange molekylære mekanismene involvert i spredning av cancer. Vi har valgt å bruke oversiktsartikler utgitt mellom 2016-2019 og utført en systematisk analyse av disse. Vi har også lest noen av originalkildene som er brukt i disse oversiktsartiklene.

Vi vil også takke vår veileder professor Magne Bryne for god hjelp og veiledning!

## **Kreftcellenes metastaseringssevne**

Tumorceller har evne til å metastasere. Kreftcellene vil spre seg fra den primære tumoren til andre deler av kroppen. Dette vil kunne gi opphav til mikro- og/eller makrometastaser. På den måten vil kreftcellene kunne påvirke funksjonen til en eller flere vitale organer og redusere pasientens prognose betraktelig (2). Dessuten vil signalsystemene som aktiveres under metastaseringsprosessen også ha innvirkning på behandlingsresistens og øke risiko for residiv (3).

Metastaseringsprosessen består av flere komplekse steg der kreftcellene løsrives fra primærtumoren og reiser via lymfesystemet og/eller sirkulasjonssystemet til andre vev. Selv om kreftceller løsriver seg fra primær tumoren er det få som lykkes i å kolonisere et annet vev og danne sekundærmestastaser. Metastasekaskaden er en ineffektiv prosess, hvor tumorcellene har liten sjanse for å overleve. Dessuten er interaksjonen mellom mikromiljøet og kreftcellene essensiell for at de skal klare å kolonisere og vokse i et nytt vev. Tumorcellene må få overlevelsessignaler og vekstfaktorer slik at de ikke går i en latent fase eller dør via apoptose/anoikos (2).

Kreftsvulster i visse vev har høyere tendens til å metastasere enn andre typer kreft. Årsaken til dette er ikke helt klar. Generelt er de ulike stegene for metastasering ganske like for alle typer kreft, men ulike tumorer kan utnytte forskjellige pathway for metastasering (4).

## **EMT**

Epitelial- mesenkymal transisjon (EMT) er en prosess hvor man får en fenotypisk endring av epitelceller. Epitelceller mister sine egenskaper og tilegner seg egenskaper som er karakteristiske for mesenkymale celler. Den mesenkymale fenotypen gir cellene økt motilitet og bedre invasjonskapasitet. Epitelcellene vil miste sin cellepolaritet, celleadhesjon og cytoskjelettet vil reorganiseres. Slike endringer i cellenes fenotype kan skje under fysiologiske prosesser slik som under embryogenesen, men da under velkontrollerte forhold. Ved patologiske tilstander vil derimot denne prosessen være mer ukontrollert og ufullstendig. Tumorcellene vil utnytte seg av disse egenskaper for å infiltrere omliggende vev og migrere fra primærtumoren.

Epitelceller uttrykker normalt E-cadheriner som er kalsium avhengige dimerer i homofile bindinger. Disse er viktige for celle-celle adhesjon. EMT prosessen starter med at cellene mister sine adhesjonsproteiner, deriblant E-cadheriner, claudiner, occludiner og cateniner. Deretter vil cellene begynne å uttrykke mesenkymale markører slik som N-cadherin og vimentin (3). In vivo forsøk

utført på transgene mus modeller viste at delesjon av E-cadherin genet førte til en overgang fra en vel differensiert adenom til et invasivt karsinom ved pankreatisk cancer (5).

Økt uttrykk av mesenkymale gener slik som N-cadherin, fibronectin og vimentin bidrar til at cellene får egenskaper som er typisk for mesenkymale celler som cellemotilitet, dannelse av nye membranprotrusjoner, som invadopodia, og nedbrytning av ekstracellulærmatriks (6). EMT vil på den måten bidra til metastasering ved å fremme invasjon og spredning av tumorcellene (7).

Disse fenotypiske endringene krever signaler for å kunne settes i gang. EMT er en dynamisk prosess med flere overlappende signalveier som induserer prosessen. Blant de mest sentrale signalveiene er TGF- $\beta$ , WNT, NOTCH og tyrosine kinase reseptor, som alle bidrar til induksjon av EMT under cancerutvikling. Som respons på ulike signaler vil man få oppregulering av EMT-induserende transkripsjonsfaktorer. Disse vil føre til morfologiske, cellulære og molekylære endringer (6). Eksempler på transkripsjonsfaktorer er Snail familien, zink finger E-box binding (ZEB) faktorer og basic heliks- loop- heliks faktorer (3).

### **TGF- $\beta$**

TGF-  $\beta$  er et cytokin som sekreses av tumorceller og fibroblaster. Dette molekylet er med på å regulere EMT via SMAD- avhengige og SMAD- uavhengige signalveier.

SMAD er en proteinfamilie som er viktig for signaloverføring via aktivering av TGF- $\beta$  reseptorer. Ved den SMAD- avhengige signalveien vil binding av TGF- $\beta$  til reseptor type I (T $\beta$ RI) fremme transkripsjon av EMT induserende gener. Genene koder for transkripsjonsfaktorer slik som Snail, Slug, Twist og zink-finger E-box binding 1/2 (ZEB1/2). Aktivering av T $\beta$ RI vil føre til fosforylering av SMAD2 og SMAD3 som danner et kompleks med SMAD4 og translokteres til kjernen. Dette komplekset vil bidra til å fremme transkripsjon av disse transkripsjonsfaktorene. Når det gjelder den SMAD uavhengig signalveien vil det skje en fosforylering av PAR6, noe som resulterer i oppløsning av tight junctions mellom epitelcellene.

TGF- $\beta$  fungerer normalt som en tumorsuppressorgen i premaligne celler, men omformes slik at den fremmer invasjon og metastasering i karsinogene celler. Hvordan denne omformingen skjer har man ikke klart å kartlegge fullt ut ennå. I en ny studie ser man at 14-3-3 $\zeta$  (regulatorisk molekyl) kan endre TGF-  $\beta$  sin funksjon fra tumorsuppressor til metastasepromotor i brystkreft. Dessuten har

Six1 (zink finger) blitt identifisert som en potensiell mediator for omformingen av TGF  $\beta$  funksjon. MiR-155-mediert tap av C/EBP $\beta$  kan også bidra til dette(2).

### **Wnt og Notch**

Wnt og Notch signalveier har også en sentral rolle i induksjon av EMT ved siden av TGF- $\beta$ .

Canonical Wnt signalveien er mediert av  $\beta$ -catenin, som er involvert i en type celleforbindelser kalt adherens junctions, som binder E-cadherin til cytoskjelettet (2). Disse er ikke bare viktige for strukturen i epitelvevet, men regulerer også en rekke signalveier via deres assosierte proteiner. Et eksempel på dette er  $\beta$ -catenin som frigjøres fra adherens junctions (6). Ulike molekyler vil bidra til aktivering av Wnt/ $\beta$ -catenin signalveien slik som miR-374a og LGR5 (2).

Wnt kan også virke via to andre non-canonical signalveier, som «planer cell polarity» og Wnt/kalsium pathway. Disse har lite innvirkning på EMT-prosessen og virker derimot på ulike enzymer og molekyler som gir økt motilitet. Dette utdypes nærmere under avsnitt om motilitet (6).

Notch er et onkogen som er assosiert med tumorprogresjon. Den bidrar til metastasering, resistens mot anoikis, EMT, neoangiogenese, celleproliferasjon og endring i vevets mikromiljø. Dessuten kan Notch også virke som tumorsuppressorgen. Notch signalvei starter med interaksjon av Jagged ligander med Notch reseptorer, noe som fører til utskillelse av NOTCH intracellulær domene (NICD). Det er dette molekylet som virker i cellen og fører til transkripsjon av EMT-induserende gener (3). Notch signalvei fremmer EMT og tumormetastase via inhibisjon av miR23b og miR-200 familien eller oppregulering av E2F1, ZEB1 og GATA- bindende faktorer.

Hedgehog-familien er en annen gruppe molekyler som promoterer EMT. Det mest studerte proteinet er Shh. Denne stimulerer Gli proteiner som migrerer til cellekjernen og transaktiverer eller undertrykker ulike gener. Det finnes andre molekyler som bidrar til induksjon av EMT. Et eksempel på dette er homeobox B7 (HOXB7) som binder til promotoren til TGF- $\beta$ 2 (2).

### **Transkripsjonsfaktorene**

Generelt vil transkripsjonsfaktorene SNAIL og ZEB binde seg til E-box sekvenser på promotorer for E-cadheriner og undertrykker transkripsjon av disse. SNAIL og ZEB familiene har også vist å nedregulere tight junction proteinene occludin, claudin, ZO-1 og connexin JAM1/A.

Studier har vist at økt uttrykk av SNAIL1 i brystkreft cellelinjer førte til tap av E-cadherin- mediert celle-celle adhesjon, og en overgang fra epitelial til mesenskymal morfologi. Dette ga økt migrasjon og invasjon av tumorcellene (8, 9) .

Twist er en basisk heliks-loop-heliks transkripsjonsfaktor som nedregulerer uttrykk av E-cadheriner via induksjon av transkripsjonsfaktoren SNAIL2. Studier viser også at TWIST1 induserer invadopodia- mediert matriks nedbrytning og bidrar på den måten til nedbrytning av basalmembran under EMT. Ved knockdown av TWIST1 i brystkreft 4T1 celler, undertrykte man den metastatiske evnen til 4T1 celler fra brystkjertel til lunge i mus (6).

### **Mellomstadier av E/M stadier**

Ikke alle krefttyper gjennomgår en fullstendig EMT. Man vet at ved noen tumortyper får cellene en rekke mesenkymale egenskaper uten å gjennomgå en fullstendig EMT (10). Dette styrkes av at nyere forskning avdekket at EMT og MET er prosesser som representerer to endepunkter, og at det kan være ulike mellomstadier av disse tilstede i en tumor. Hybride E/M stadier tillater rask adaptasjon til ulike miljøer (11-13). Studier har påvist faktorer som stabiliserer hybrid E/M fenotype. Dette er blant annet OVOL og GRHL2. Det finnes likevel ikke klar evidens for dette (7).

### **Hemming av EMT**

Ulike studier har vist at noen cancer subtyper med dårlig prognose har en sterk EMT signature (14, 15). Dessuten har uttrykk av EMT- transkripsjonsfaktorer blitt korrelert med utilfredsstillende respons på behandling og har muligens en rolle i resistensutvikling mot kjemoterapi (16). De siste 20 årene har det derfor blitt lagt stor vekt på forskning rundt EMT og flere av behandlingsprinsippene for kreft innebærer inhibisjon av faktorer som induserer dette(6).

Forkhead box transcription factor A2 (FOXA2) hemmer EMT ved lungekreft ved å binde seg til Slug promotor. Andre molekyler vil kunne hemme EMT ved ubiquitinerings av komponenter i TGF- $\beta$  signalveien slik som TRIM62 og RAB1B. Visse mikro-RNA har også en undertrykkende effekt på EMT. Dette fasiliteres via miR-206 som påvirker SMAD2, miR-125b som påvirker SMAD 2 og SMAD4, mens miR-630 påvirker Slug(2). Andre negative regulatorer av EMT- transkripsjonsfaktorer er OVOL, GRHL2 og ELF5 som direkte undertrykker transkripsjon av ZEB1 og SNAIL2 (6).

EMT og metastasering vil også påvirkes via post-translasjons modifikasjoner av TGF-  $\beta$  molekyler.

F.eks. vil ubiquitin spesifikk protease 4 fungere som en deubiquitinerende enzym for T $\beta$ RI og på den måten motvirker degradering av T $\beta$ RI. TGF  $\beta$ , Wnt og Notch er alle sentrale i regulering av EMT. De har gjensidig regulering på hverandre og samarbeider for å fremme EMT og tumor metastasering (2).

## INVASJON

### Cellemotilitet

For at tumorcellene skal nå lymfe- og blodkar er det nødvendig at cellene har evne til motilitet. Cellemotilitet krever kontinuerlig reorganisering av aktin cytoskjelettet i ulike deler av cellen. Dessuten krever det etablering og løsrivelse av feste mellom migrerende celler og ekstracellulær matriksen (ECM) (4).

Prosessen starter med at cellen forlenges i retningen den ønsker å bevege seg mot. Dette innebærer protrusjon fra celleoverflaten av en lamellipodium som er en bred, flat struktur (4). Den dannes ved aktin polymerisering på den siden av cellen (17). Samtidig vil proteaser degradere proteiner i ECM som er i veien for den migrerende cellen. Mens dette pågår vil cellen uttrykke integriner for å danne nye festepunkt mellom lamellipodiumet og ECM på leading edge og bryter feste ved «trailing egde» (4). Videre vil det oppstå en kontraksjon mediert av aktomycin som driver cellen fremover. Dette er en syklisk prosess og vil gjentas mange ganger slik at cellen beveger seg videre (17). Fra lamellipodiumet er det tynne strukturer som kalles filopodia som stikker ut. Man tror at funksjonen til disse strukturene er å utforske området som ligger foran cellen. Disse strukturene vil i likhet med lamellipodia dannes ved reorganisering av aktin fibre (4).

Organisering og polymerisering av aktin i ulike cytoskjelettstrukturer er regulert av proteinfamilien Rho. Det er en familie av GTPaser som er aktive når de er bundet til GTP og inaktive når de er bundet til GDP. Dette reguleres av aktivatorer, guanine exchange factorer (GEF), og inaktivatorer, GTPase-aktiverende protein (GAP). Aktive GTPaser induserer forskjellig aktin reorganisering ved å interagere med nedstrømseffektorer (17). Tre subgrupper er forbundet med regulering av cellemigrasjon; ras-relatert C3 botulinum toxin substrate (Rac), Ras homolog family member (Rho) og cell division 42 (Cdc42) (18).

Rac og Cdc42 regulerer aktin polymerisering. Binding av Cdc42 til myotonisk dystrofi kinase relatert Cdc42- bindende kinase (MRCK) resulterer i fosforylering av myosin II, MYPT1, LIMK1,



LIMK2 og moesin. Aktivering av LIM kinase via fosforylering tillater inaktivering av fosforyleringen av cofilin som hemmer aktin polymeriseringen.

Rac interagerer med lamellipodin og WAVE kompleks og fremmer aktin polymerisering av Arp2/3 kompleks. Rac og Cdc42 vil også påvirke andre nedstrømsmolekyler som p21- assosiert kinase (PAK). PAK1 induserer motilitet ved å føre til rask turnover av fokale kontakter via fosforylering av paxillin (17).

### **Invasjonsmåter**

Tumorcellene kan migrere som individuelle celler dersom det ikke er adhesjon mellom cellene eller de kan migrere sammen dersom de har celle-celle adhesjon. Tumorcellene har ulike strategier når de migrerer individuelt: elongated mesenchymal, rounded amoeboid, spike- mediated. Det samme gjelder når de migrerer kollektivt; multicellular streaming, tumour budding, collective invasion. Individuell cellemigrasjon er viktig for at tumorcellene skal komme i blodomløpet og spre seg til andre organer, mens kollektiv cellemigrasjon gjør det mulig for tumorcellene å entre lymfesystemet (17).

### **Kollektiv cellemigrasjon**

Tumorceller kan invadere normalt vev i klynger eller strenger. Ved noen cancertyper, slik som karsinoma, vil tumorceller migrere kollektivt i grupper ved den invasive fronten (17).

Ved kollektiv migrasjon vil cellene fremdeles gå gjennom samme motilitetsprosessen som er beskrevet tidligere, men tumorcellene vil i dette tilfellet være bundet sammen via celle-celle adhesjoner. Protrusjon og retraksjon vil da være mediert gjennom celle-celle adhesjoner og involverer flere celler. Det finnes ulike metoder for kollektiv migrasjon, og hvilken som velges bestemmes av graden av celle-celle adhesjon, celle morfologi og supracellulær kobling av celle-celle signalering (17);

#### 1. Multicellulær streaming

Ved denne migrasjonsmåten vil tumorcellene bevege seg en etter en i samme spor i vevet. Cellene vil guides via kjemokiner, morfogen gradient eller ECM strukturer.

Enkeltcellenes cytoskjelett vil virke uavhengig av hverandre ved denne type migrasjon.

Cellene her vil kunne ha rounded - ameoboid eller elongated- mesenchymal fenotype(17).

#### 2. Tumor knoppdannelse

Tumor budding er en dynamisk prosess hvor tumormassen utvider flere finger lignende multicellulære strukturer som senere løsriveres fra tumormassen til små celleklynger. Klyngene bestående av ca. 5 celler som befinner seg ved den invasive fronten (17).

### 3. Kollektiv celle invasjon

Denne migrasjonsmåten innebærer migrasjon av to eller flere naboceller. Kollektiv invasjon fasiliteres av langvarig celle-celle adhesjoner. Cellene kan ha ulik morfologi avhengig av celletype, antall celler og strukturen i vevet som invaderes. Disse gruppene kan bestå av små klynger, strenger eller større masser. De større massene kan til og med danne en indre lumen dersom epitelpolariteten opprettholdes. Noen cellestrenger kan stikke ut av primærtumoren og invadere lokalt vev og fortsatt ha cellekontakt med primærområdet. Dette sees i invasive epiteliale tumorer slik som oral plateepitel karsinom. I noen krefttyper har også celleklynger som har løsrevet seg fullstendig fra primærtumor blitt observert. (17)

I de fleste tilfeller vil den ledende fronten av en multicellulær gruppe ha en eller flere lederceller med mesenkymal karakteristika. De andre cellene vil passivt bli dratt med sammen med den etablerte migrasjonsveien via celle-celle adhesjon. Kollektiv invasjon er vanligvis den treigeste migrasjonsmåten (17).

## INTRAVASASJON

Intravasasjon beskriver det stadiet der kreftcellene går gjennom basalmembranen og inn til blod- eller lymfekar. Cellene vil da utsettes for et svært utfordrende miljø og vil møte på vertsforsvar i form av blant annet makrofager og NK-celler. Dessuten vil de utsettes for hemodynamiske skjærekrefter. Disse faktorene vil påvirke deres overlevelse og hindre dem i å nå fjerne vevsområder (2).

Tumorceller som kommer frem til lumen av lymfekar eller blodkar vil som oftest ikke være bundet til noe. Dersom tumorcellen ikke er forankret vil den gjennomgå anoikis, som er en form for programmert apoptose som trigges ved løsrivelse av en celle fra et solid substrat (4). Adhesjon til ECM, via integriner, er derfor essensiell for celleoverlevelse (2). Integrinmediert aktivering av anti-apoptose signalveier, slik som phosphoinostide 3-kinase (PI3K)/ protein kinase B (Akt), MAPK og fokal adhesjon kinase, er viktig for overlevelse (3). Det er få tumorceller som overlever i sirkulasjonen, men enkelte klarer det. Disse vil ekstravasere til annet vev. Her kan de gå i en latentstadie og kan dermed unngå kjemoterapi (2).

Flere molekyler kan mediere resistens mot anoikis av sirkulerende tumorceller. Blant annet vil integrin endosomal signal undertrykke anoikis via aktiv focal adhesion kinase (FAK) i bryst- og lungekreft celler. Andre molekyler som bidrar til anoikis resistens er insulin-like growth faktor 1 reseptor (IGF1R), claudin-1, activating transcription factor 4 (ATF4) og tyrosin reseptor kinase B (trkB) (2).

I tillegg til å unngå anoikis må disse cellene unngå immunforsvaret. TGF- $\beta$  har en viktig rolle i å fremme immuntoleranse ved at den oppregulerer CD59 på celleoverflaten, og tumorceller med høye nivåer av TGF- $\beta$  vil ha høyere sjanse for overlevelse.

Alternativt vil sirkulerende tumorceller forsøke å danne microemboli med trombocytter.

Trombocytt derivert TGF  $\beta$  og direkte trombocytt - tumorcelle kontakt vil virke synergistisk og aktivere TGF-  $\beta$ / Smad og NF- $\kappa$ B signalvei i kreftceller. Dette resulterer i transformasjon til en invasiv mesenchymal lignende fenotype (2).

### **Angiogenese (19)**

Dannelse av tumor assosierte kar kalles neoangiogenese. Rekruttering av celler som deltar i denne prosessen krever frigjøring av faktorer slik som VEGF både av tumorcellene og inflammatoriske celler slik som makrofager.

Myofibroblaster i tumorassosierte stroma kan frigjøre signaler slik som SDF-1/CXCL12 som bidrar ved å rekruttere sirkulerende forløpere av endotelceller. VEGF er også med på å hjelpe disse celle med å modnes til funksjonelle endotelceller.

Produksjon av VEGF er styrt av tilgjengeligheten av oksygen. Ved hypoksi vil protein-komplekser føre til akkumulering av HIF transkripsjonsfaktorer i celler. Dette vil føre til uttrykkelse av en rekke gener som fremmer angiogenese, deriblant VEGF. VEGF er en vekstfaktor som fungerer som ligand for tyrosin kinase reseptor. I dette tilfellet er det VEGF reseptor 1 og VEGF reseptor 2 som finnes på endotelcellers overflate. Når endotelcellene blir stimulert vil de proliferere og konstruere kapillærer.

Dannelsen av blodkapillærer er en komplisert prosess hvor en rekke andre faktorer, i tillegg til VEGF, spiller en viktig rolle. TGF- beta, bFGF, IL-8, angiopoietin, angiogenin og PDGF er eksempler på slike faktorer.

I tillegg til endotelceller, bidrar også pericytter og glattmuskelceller i konstruksjonen av kapillærer. Kapillærer i tumor har vanligvis en diameter som er 3 ganger så stor en kapillærene ellers. Dessuten er blodkapillærene i tumorer langt mer kaotisk distribuert og organisert sammenlignet med normalt vev. Disse karene har dessuten høy permeabilitet.

Hypoksi vil trigge p53 avhengig apoptose. Hypoksi vil også føre til celledød via mangel på næringsstoffer til cellene, høy karbondioksid nivå, metabolske avfallsstoffer og lav pH som følge av akkumulering av laktat.

Tegn på begynnende angiogenese ser man i underliggende bindevev allerede før tumoren har brutt basalmembranen. Selv om tumorcellene ganske tidlig i vekstfasen vil begynne å produsere VEGF, for å blant annet indusere angiogenese, vil de ikke lykkes med dette på starten. Dette skyldes at kroppen har forsvarsmekanismer som hindrer VEGF til å utøve sin funksjon ved at de vil spaltes av omkringliggende ekstracellulær matriks. Dette vil føre til at tumor ekspansjonen i nærliggende vev vil være begrenset som følge av hypoksi. Etter hvert vil tumor frigjøre seg fra denne begrensningen ved å gjennomgå en «angiogenisk switch» ved hjelp av MMP -9. MMP-9 vil fungere ved å kløyve spesifikke komponente av ECM og tillater dermed VEGF i å utøve sin aktivitet. MMP-9 frigjører av inflammatoriske celler slik som mastceller og makrofager. Dette steget er svært viktig for angiogenesen og dermed videre veksten av tumoren.

## **EKSTRAVASASJON OG KOLONISERING**

Når tumorcellene entrer sirkulasjonen har de i utgangspunktet potensiale til å disseminere til hvilket som helst vev. Likevel har man klinisk observert at det er vevs-tropisme. Det er omdiskutert om fenomenet skyldes en passiv prosess der sirkulerende tumorceller akkumuleres i kapillærsenger eller om det er en mekanisme hvor disse tumorcellene drar til spesifikke vev via ligand- reseptor interaksjoner med karveggen. Lunge, bein og hjerne er de vevene som metastasering skjer hyppigst til (2).

Ved adkomst til nytt vev må tumorcellene danne en niche som fremmer koloniseringen(6). Sirkulerende kreftceller vil være i et latent stadium. De vil derfor når de entrer målorganet for metastasering, ikke umiddelbart proliferere(2). Disse vil først danne en mikrometastase(6).

## **MET**

Kliniske observasjoner viser at karsinommetastaser vanligvis har en epitelial cytologi, der metastasen har samme histologi som primærtumoren(2). Disse funnene er ikke nødvendigvis motstridene mot at tumorceller ofte gjennomgår EMT(6). Selv om EMT fremmer migrasjon av tumorceller, vil den ofte hindre celleproliferasjon og makrometastasing. På koloniseringsstedet vil celler som har gjennomgått EMT gå gjennom en reverseringsprosess MET(2), som er nødvendig for dannelse av makrometastaser. Man kan altså se på EMT som en dynamisk, reversibel prosess(6). TGF- $\beta$  er en sentral regulator av MET. Undersøkelse av plateepitel karsinom viste at Twist fremmet kreftcelle spredning, men makrometastase krevde reduksjon av Twist(2). Tsai et al. brukte DMBA-TPA karsinogen induisert hudtumor i mus for å demonstrere at induksjon av TWIST1 i primærtumoren fremmer overgangen fra en benign papilloma til en invasive plateepitel karsinom. Tumorcellene gikk gjennom EMT som respons på TWIST1 induksjon. De invaderte basalmembranen og et stort antall tumorceller intravaserte inni sirkulasjonen. Vedvarende induksjon av TWIST1 i tumorceller som hadde nådd et annet vev resulterte ikke i dannelse av en makrometastase. Redusert uttrykk av TWIST1 derimot førte til reversering av EMT, som igjen resulterte i dannelse av metastatiske knuter i det nye vevet(6). Det samme er tilfellet ved EMT transkripsjonsfaktoren paired related homeobox 1 (Prrx-1), som fremmer spredning fra brystkreftceller, mens nedregulering av Prrx-1 induserer MET(2).

## **ANDRE MOLEKYLER MED EN VIKTIG ROLLE I TUMORPROGRESJON**

### **Matriks metalloproteinasers rolle i tumorprogresjon (20)**

Som vi tidligere har nevnt er metastasering noe av det som gjør kreft så dødelig. Metastasering skjer som sagt gjennom en rekke mekanismer, blant dem har matriks metalloproteinaser (MMPs) vist seg å være svært sentral. Flere studier viser økt ekspresjon av disse enzymene ved aggressive former for kreft.

Matriks metalloproteinaser er sink avhengige endopeptidaser, som er involvert i remodulering av vev og organutviklingen. Avvik i uttrykk av disse enzymene har vist seg å være assosiert med en rekke sykdommer, alt fra autoimmune sykdommer til cancer. MMP er med på å degradere ECM og bidra til intravasjon, migrasjon og angiogenese. Studier viser at disse også kan manipulere aktiviteten til en rekke molekyler, som blant annet cytokiner og vekstfaktorer og dermed kontrollere mikromiljøet rundt tumoren.

Det finnes totalt 24 ulike MMP hos mennesker. Ekspresjon av disse er regulert av en rekke hormoner og inflammatoriske molekyler samt intercellulær og matriks interaksjoner. Normalt har et voksent individ lave nivåer av MMP, men ved tilheling av sår og vevsreparasjon ved patologiske tilstander vil nivået øke. Substratet til MMP inkluderer kollagen, gelatin, elastin, og proteoglykaner, men MMP har også effekt på et bredt spekter av andre proteiner. MMP deles inn i mange ulike kategorier, enten basert på deres struktur eller deres funksjon. Et substrat kan brytes ned av flere MMP, og en type MMP kan bryte ned flere ulike substrat, noe som gjør hemming av en enkel funksjon av MMP vanskelig. På grunn av MMPs evne til å degradere ECM er deres aktivitet nøye regulert i friskt vev. MMP syntese kontrolleres på transkripsjons- og translasjonsnivå, samt via posttranslasjon-modifikasjoner. De sekreses som proenzymmer som senere blir aktivert via en to-steps mekanisme.

MMP er kjent for å påvirke metastaseringssevnen til cancer, og høye nivåer av MMP assosieres med økt tumoraggressivitet. Ved å studere ekspresjon av ulike MMP, så man at oppregulering av MMP-1 førte til økt metastasering, men nedregulering av MMP-2 førte til nedsatt tumorvekst og formering av noduli i lungene. Nedregulering av MMP3 hadde lite effekt på tumorprogresjon og metastasering, men både invasjon og migrasjon ble nedsatt ved nedregulering av MMP-7 og MMP-9. Disse observasjonene viser at en rekke MMP er viktige for metastasering.

Flere molekyler har vist seg å ha en effekt på den migratoriske evnen til en tumor ved å interagere med MMP. Et av dem er Timosaponin AIII, TAIII, en type spirostanol saponin. Denne nedregulerer ekspresjon av MMP-2 og MMP-9 på budbringer- og proteinnivå, og er dermed med på å hemme metastasering av cancer. Ekspresjon og aktivering av MMP involverer tre store MAPKs (mitogen-aktiverede protein kinaser). TAIII har vist å inhibere aktivering av en av disse tre, men har ikke noe effekt på de to resterende. En annen måte TAIII regulerer MMP på er via Src/FAK-signalveien. Disse observasjonene tyder på at TAIII, via flere mekanismer, har en anti-migratorisk og anti-invasiv effekt. Et annet molekyl som regulerer metastaseringspotensialet til tumor via interaksjon med MMP er TIMP-2. TIMP-2 er en hemmer av MMP-2. Det er vist at overekspresjon av TIMP-2 øker kjemosensitiviteten til tumoren og svekker den evnen til migrasjon. TIMP-2 stimulerer også tumorsuppressor budbringere, og er med på å direkte hemme migrasjon og invasjon av tumorceller.

Det er gjort studier som viser at en rekke nye MMP-inhibitorer er med på inhibere MMP også etter at de transkribert, aktivert og sluppet ut i ECM. Den eksakte mekanismen for inhibisjon er enda

ikke helt forstått, men mye tyder på at enkelte av disse fanger og nøytraliserer flere typer MMP. Et molekyl som derimot viser sterk korrelasjon med økt nivå av MMP er STAT3. STAT3 er en transkripsjonsfaktor som er aktiv i de fleste tilfeller med lungecancer. Studier gjort på biopsier av lungecancer viste sterk korrelasjon mellom nivå av aktivert STAT3 og MMP-1, og disse viste å ha flere invaderende egenskaper.

Angiogenese er et kjennetegn ved solid tumor, og er svært viktig for metastasering. Flere studier viser at det hypoksiske miljøet i en tumor stimulerer til angiogenese via MMP. Denne konklusjonen dras ved at det er gjort studier i mus som viser at tumorindusert angiogenese var redusert i mus med MMP-2 mangel, samt in vitro studier som viste at MMP-2 inhibisjon ga redusert angiogenese.

Flere epigenetiske forandringer bidrar til silencing av tumorsuppressorer og aktivering av onkogener. Dette skjer hovedsakelig ved at DNA sekvenser som koder for ugunstige gener for tumoren blir metylert. Denne metyleringen fører til at genene blir undertrykt, noe som igjen gir reduserte nivåer av inhiberende molekyler og tumoren kan vokse. Det er blitt forsket på om det er mulig å endre ekspresjon av enkelte tumorsuppressorgener, slik at man kan kontrollere tumorprogresjonen. En studie, gjort både in vitro og in vivo, har vist at fibulin-3 undertrykker vekst av lungecancer. I tumorvev ble det vist at nivået av fibulin-3 var noe lavere enn i normalt vev, mulig grunnet økt metylering av fibulin-3 promotor. Overekspresjon av fibulin-3, ga derimot redusert invasjon ved hemming av aktiviteten til MMP-2 og MMP-9. Det ble også vist at DNA hypermetylering av fibulin-5 induserte metastase i NSCLC ved å gi økt nivå av MMP5.

Det er som sagt blitt observert at det er sterk korrelasjon mellom MMPs og økt metastasering av lungecancer. Det er derfor blitt forsket på om det er en relasjon mellom nivå og ekspresjon av de ulike typer MMPene og overlevelsesraten hos lungekreftpasienter for å se om nivå av MMP kan brukes som en prediktor for prognosen. Det er gjort flere studier som ser på nivået av MMP i biopsier og blodprøver fra lungepasienter. Det ble vist at økt nivå av MMP-2 var sterkt assosiert med dårlig prognose. Det samme viste forsøk som så på nivå av MMP-1, MMP-7, MMP-12, MMP-13 og MMP-26. For MMP-9 var det varierende resultater. Enkelte studier konkluderte med at nivå av MMP-9 ikke hadde noe prognostisk verdi, mens nyere studier viser at også her er det korrelasjon mellom økt nivå av MMP og dårlig prognose. Det kom også frem at økt nivå av TIMP-1 i lungecancer biopsi var assosiert med mer fordelaktig prognose, dog var ikke forbedringene signifikant.

Bestråling har blitt brukt som et middel for å bekjempe og begrense kreft i over 100 år. Progresjon av de maligne cellene blir svært effektivt stanset/reduert av bestråling, ved å påføre irreversible skader på DNA, noe som fører til celledød. Bestråling har også vist å ha en antitumor effekt ved å øke anticancer immunitet ved hjelp av natutral killer group 2 menner D lingand. Interessant nok har også bestråling vist å ha som bivirkning å promotere metastase, ved å indusere MMP. Disse reduserer ekspresjon av NKG2D, og kreftcellene kan flykte fra NK-mediert anticancer resistens. Man konkluderte da med at bestråling, sammen med MMP inhibitorer ville redusere den metastatiske bieffekten av ioniserende bestråling. En ny studie viste at nadroparin, en lav-molekylvekt heparin, kombinert med bestråling, ga nedsatte metastatiske egenskaper i lungecancer. Bestrålingsindusert MMP-2 ekspresjon ble inhibert av nadroprarin på en tid- og doseavhengig måte. Det er også gjort forskning som viser at en rekke andre molekyler (MMPI) har tilnærmet samme effekt, dog via andre mekanismer, blant annet Podophyllotoxin acetate, bicistronic construct og Ad-MMP-2-si. Felles for alle disse er at de kombineres med bestråling og virker ved inhibere MMPs.

Basert på publisert litteratur kan vi konkludere med at MMPs er assosiert med progresjon og metastasering av lungecancer, men den eksakte rollen av MMP i lungecancer er fremdeles ikke fullstendig definert. Flere MMP-inhibitorer blir brukt i klinikk, men deres virkningsmekanismer og effekt er fremdeles usikker. Mer forskning, og flere prospektive, longituduelle studier trengs for å kartlegge virkningsmekanismen til de enkelte MMPene og for å utvikle individuelle MMP inhibitorer.

### **Notch, Wnt og Hedgehog (3)**

Flere signalveier, som Notch, Wnt og Hedgehog, kontrollerer proliferasjon, celledød, motilitet og migrasjon. Disse er svært viktige signalveier, spesielt under fosterutviklingen, men også ved sårtilheling. Men disse systemene finnes også i solide tumorer og i sekundære metastaser. De bidrar til initiering av cancer fra solide tumorer ved at de favoriserer utvikling av cancer stamceller.

Notch er en utslagsgivende onkogen assosiert med tumorprogresjon til metastasering, EMT, neoangiogenese og endringer i mikromiljø for å danne nisje på sekundær site. Men det er også vist at Notch kan være en tumorsuppressor i noen tilfeller. Notch er en familie med transmembrane proteiner med fire reseptorer og 5 ligander. Reseptor bindes til ligand på en annen celle, og dette fører til frigjøring av aktivert intracellulær domene, NICD. Denne går til kjernen og danner transkripsjonal kompleks sammen med andre molekyler. Dette komplekset promoterer ekspresjon av en rekke gener involvert i å avgjøre cellens skjebne. Produktene av denne vil være med på å



kontrollere proliferasjon, adhesjon, celledød, invasjon og undertrykke anoikis. Notch har også vist å trigge migrasjon og invasjon i brystkreft.

Alle effektene nevnt ovenfor ble opphevet av Notch silencing. Dette gjør Notch-basert terapi en aktuell forskningsemne. Det forskes på en rekke ulike måter å stanse eller begrense de ulike stegene i kaskaden. GSI, gammasecretase kompleks, brukes ofte i anticancer preklinisk forskning. Denne oppnår total blokkade av Notch, noe som har vist å ha en stor antineoplastisk effekt. Også delvis blokkade har vist å ha en anstendig effekt, man retter derfor forskning mot Notch ligand eller reseptor. Dette har vist å ha mindre gastrointestinale bivirkninger som gjerne oppstår ved uspesifikk Notch-targeting (GSI).

Wnt er en ligand som binder seg til det ekstracellulære domenet på fizzle familie av reseptorer. Dette trigger en kaskade som resulterer i ekspresjon av gener involvert i stamcellevedlikehold, celleoverlevelse og proliferasjon. Overekspressjon kan aktivere signalveier som favoriserer «stemness» og kjemoterapiresistens. Inhibering av Wnt har vist å ha en revers-EMT effekt, i tillegg til andre antineoplastiske effekter. Man er likevel bekymret for pasientsikkerheten ved bruk av disse inhibitorene, da inhibering av Wnt også inhiberer en rekke signalveier som er viktige for vedlikehold av stamceller og vevshomeostase. Mer forskning må gjøre for å se om man kan inhibere spesifikke effekter, for å unngå disse bieffektene.

Hedgehog familien består av tre ulike typer ligand-modifiserte proteiner, hvor Sonic Hedgehog (Shh) er det mest utforskede. Disse er ligander som binder seg til 12-pas transmembran proteiner. Uten Hedgehog vil disse proteinene holde på en inaktivert Smo og når Hedgehog bindes til reseptor, løsner Smo og aktiveres. Disse aktiverer Gli-proteiner som går til kjernen og transaktiverer eller undertrykker ulike gener. Høye nivåer av Gli korrelerer med utvikling av metastasering i colon cancer, og knockdown av Gli gir nedsatt migrasjon og invasjon i hepatocytter. Dette gjør at det forskes på å utvikle Hedgehog baserte behandlinger/medisiner mot cancer. En av de vanligste medikamentene som rettes mot Hedgehog pathway er Smo-inhibitorer. En av ulempene med å bruke disse er at de er ustabile og gir en rekke bivirkninger. Flere studier utføres derfor på nyutviklede varianter for å se om man kan underminere ulempene.

## **IMMUNSYSTEMETS ROLLE I KREFT**

Kreft-assosiert inflammasjon er tilstede i mer eller mindre alle stadiene av tumorgenese. Dette har gjort immunsystemets rolle til en essensiell del av forskningen innen kreft, da en blir nødt til å

spørre om hvordan kreftceller unngår destruksjon. Ved hjelp av forskning har vi funnet en del bevis på at denne inflammasjonen bidrar til genomisk ustabilitet, epigenetiske modifikasjon, induksjon av kreftcelleproliferasjon, økt apoptose resistens og stimulering av angiogenese mm. (21). Det er blitt lagt en del fokus på hvordan immunceller påvirker de ulike stadiene i utvikling og spredning av kreft.

Det er i dag akseptert at kronisk inflammasjon er en av kjennetegnene på kreft. De underliggende årsakene kan være mikrobiell infeksjon, autoimmunitet eller immun deregulering. Mens kronisk inflammasjon er kjent for å ha en viktig rolle, vet vi mye mindre om akutt inflammasjon og dens rolle i tumorprogresjon. Immunsystemet tenkes å ha en dual rolle, hvor inflammasjon kan føre til utvikling av kreft, men kan også føre til eliminering av tumorceller og forhindre utvikling av kreft. Dette forsterkes blant annet av studier som viser at immunsupprimerte pasienter oftere diagnostiseres med kreft, men at langtidsbrukere av NSAID, som undertrykker immunsystemet, har lavere risiko for å utvikle kreft (22).

Vi vet i dag at et avvikende medfødt og ervervet immunrespons bidrar til tumorgenese ved å selektere aggressive kloner, indusere immunsuppresjon og stimulere kreftcelleproliferasjon og metastase. I tidlige stadier av tumorutvikling vil cytotoksiske celler, som NK-celler og CD8+ T celler eliminere de mer immunogene kreftcellene. Dette gjør blant annet at de mindre «synlige» kreftcellene proliferer og kan utvikle seg til en tumor som er vanskelig å fange opp. Etterhvert som tumoren vokser, vil ulike undergrupper av inflammatoriske celler være tilstede og påvirke tumorens skjebne. Blant annet vil høye nivåer av tumorinfiltrerende T celler, i mange tilfeller, korrelere med god prognose, mens høyere nivå av makrofager vil korrelere med dårligere prognose (22).

### **Makrofager (23)**

Makrofager er en av de mest rikelige immuncellene i svulstens mikromiljø og deres tilstedeværelse korrelerer med redusert overlevelse i de fleste kreftformer. Vi finner makrofager i alle steg av tumorprogresjon. De stimulerer til angiogenese, tumorcelle invasjon og intravasasjon ved primærsetet.

På metastasesetet vil makrofager og monocytter også ha en sentral rolle. De vil forberede området for tumorcellene som har revet seg løs fra primærtumoren. De fremmer deres ekstravasasjon og overlevelse ved å hemme immunmedierte clearance eller ved å direkte fremme tumorcellene til å

aktivere pro-overlevelses signalveier. Dessuten promoterer makrofager vekst av disseminerte tumorceller på metastase stedet ved å fremme dannelsen av en metastase niche.

Under fysiologiske forhold har makrofager en sentral rolle i vevets homeostase og immunitet. Det er to undergrupper av monocytter; inflammatoriske monocytter og patruljerende monocytter. Inflammatoriske monocytter rekrutteres til inflammasjonsområdet under patologiske forhold, også ved kreft, via kjemokiner CSF-1, CCL2 og SDF-1 $\alpha$ . De vil ekstravasere og differensieres til makrofager.

Makrofager kan deles inn i to fenotyper basert på deres respons til IFN $\gamma$  og LPS (kalles M1 makrofager) eller IL-4 og IL-3 (kalles M2 makrofager). M1 fenotypen er assosiert med produksjon av proinflammatoriske cytokiner slik som IL-12, IFN $\gamma$  og TNF $\alpha$ , antigen presentering og danner reaktive oksygen radikaler. M2- fenotypen er derimot assosiert med produksjon av anti-inflammatoriske cytokiner slik som IL-10 og fremmer vevsremodulering. Det er dog mange mellomstadier mellom M1 og M2 fenotypen som makrofager kan befinne seg i.

Tumor assosierte makrofager (TAM) har en M2 lignende fenotype. TAM blir rekruttert til tumor områder der det er hypoksi via tumorcelle derivert VEGF-A og semaphorin 3A gjennom VEGFR1/neuropillin-1 signallering. TAM vil, i disse hypoksiske områdene, promotere angiogenese ved å nedregulere neuropillin-1 og semaphorin 3A - mediert Plexin A1/A4 signalvei. Blodkarene som dannes i tumorvevet vil være uregelmessige med høy grad av forgrening.

Makrofager fremmer invasjon og metastase fra primærtumor via en autokrin signaleringsvei. Denne autokrine signalveien involverer produksjon av CSF-1 fra kreftceller som bidrar til at makrofager produserer epidermale vekstfaktorer. Sammen med makrofag derivert VEGF-A fremmer dette kreftcelle intravasasjon til blodkar. Makrofager fremmer også ekstravasasjon. Dissimilerte kreftceller produserer CCL2 som rekrutterer inflammatoriske monocytter fra blodet til metastase stedet. Monocyttene vil sekreere VEGF-A og fremmer ekstravasasjon ved å øke karpermeabiliteten.

Makrofager er på den måten med på å promotere ulike stadier ved selve metastaseringsprosessen, deriblant ved å danne en premetastatisk niche, fremme invasjon, intravasasjon, ekstravasasjon og kolonisering. Studier har også vist at makrofager spiller en viktig rolle i utvikling av resistens mot kjemoterapi.

### **Nøytrofile granulocytter**

Nøytrofile granulocytter er noen av de første immuncellene til å bli rekruttert til et skadet vev, og de kan eliminere patogener og regulere inflammasjonen ved hjelp av fagocytose, sekresjon av antibakterielle proteiner, eksocytose av proteaseholdige granuler og legge nøytrofile ekstracellulære feller (NETs) (24). Høye nivåer av tumorassosierte nøytrofile granulocytter (TANs) og høy nøytrofil/leukocyt ratio har blitt assosiert med dårligere prognose i ulike maligne tilstander. Det har blitt foreslått at TANs, på lik linje med TAMs (tumor-assosierte makrofager), eksisterer i to ulike polariserte tilstander kalt N1 og N2, som henholdsvis beskriver de protumor og antitumor populasjonene. Dette er det en del debatt rundt, da man mangler de spesifikke markørene for å indentifisere disse. Det som derimot er bevist er at TAN har en heterogen funksjon (22).

I xenograft modeller av melanom og lungekreft vil TANs som uttrykker hepatocytisk vekstfaktor reseptor (c-MET) spille en viktig anti-tumor og anti-metastatisk rolle. C-Met ekspresjon vil induseres av tumor-derivert TNF $\alpha$ . Den mest sannsynlige kilden til TNF $\alpha$  inne i tumorens mikromiljø er NK celler og T celler. I human kolorektal kreft er høye nivåer av CD66b+ TAN assosiert med bedre prognose ved å øke den tumordpende kapasiteten til CD8+ T celler. I kontrast til dette bidrar IL-17-reponsiv TAN til å promotere tumor vekst i *Kras*-drevne lunge adenokarsinom. TAN bidrar dessuten til tumor neoangiogenese ved å sekretere MMP9 og VEGF i mus modeller av pankreatisk og colonkreft. Det er også blitt foreslått at nøytrofile granulocytter fungerer som pioner celler i lungenes premetastatiske nisje, og støtter adkomsten til spredte celler i MMTV-PyMT modell. Som respons på sekresjon av IL-7 blir nøytrofile granulocytter rekruttert til lungene hvor de støtter overlevelse og proliferasjon av de nyankommede cellene ved å undertrykke effektor CD8+ celler (22).

Det er i økende grad blitt anerkjent at nøytrofile granulocytter er involvert i de ulike stegene ved utvikling og spredning av cancer, men det er nødvendig med mer forskning på om det eksisterer ulike fenotyper, samt hvordan nøytrofile granulocytter programmeres eller omprogrammeres. Mer kunnskap og bedre forståelse av dette kan gjøre oss i stand til å utvikle bedre terapier (22).

### **Natural killer celler**

Natural killer celler, NK celler, er en del av det medfødte immunsystemet, og har en rask og potent cytolytisk aktivitet som respons på skadete, inflammete eller transformerte celler. Disse cellene har en rekke inhiberende og stimulerende reseptorer på overflaten som bidrar til immunovervåking. De inhibitoriske reseptorene binder seg til kreftceller som mangler major histokompatibilitetsklasse

I (MHC-I), og markerer dem for programmert celledød, mens i friske celler vil bindingen av MHC-I molekylet inhibere NK-cellen. NK celler har en vel-dokumentert anti-tumor effekt (25).

Stimulerende reseptor NKG2D på NK celler har evne til å gjenkjenne ulike ligander som produseres ved DNA skader, aktivering av RA systemet og ved avvikende celleproliferasjon. Dette gjør NKG2D til en svært viktig reseptor, og studier viser at mus med mangel på denne reseptoren har økt risiko for utvikling av tumor (22).

Det finnes også en rekke andre stimulerende reseptorer som bindes til tumor-deriverte ligander og aktiverer NK cellene. Ved aktivering vil NK celler angripe tumorceller ved å skille ut cytotoxisk perforin og granzyme, og de vil også aktivere apoptotiske signalveien ved å produsere TNF $\alpha$  eller ved direkte celle-celle kontakt. Tett granulerte NK celler blir rekruttert inn i store solide tumorer av IL-15, hvorpå de kan eliminere den etablerte tumoren. Det finnes også en rekke annen data som beskriver NK cellenes mange anti-tumor mekanismer, men det er nødvendig med flere studier som viser hvordan det medfødte og ervervede immunsystemet aktiverer og regulerer NK cellene (22).

### **Dendritiske celler**

Dendritiske celler, DC, er spesialiserte antigen-presenterende celler (APCs) som representerer bindeleddet mellom det medfødte og det ervervede immunsystemet. Disse cellene presenterer endogene og eksogene antigener til T celler. Alle vevene i kroppen, med unntak av parenkymet i hjernen, har DC. Tumor-infiltrerende DC har blitt påvist i mange studier, og selv om deres aktivitet er svært viktig for å kunne beskrive T cellenes rolle forblir DCs involvering i kreft understudert. Det er begrenset hvor mye innsikt vi har i DCs mekanismer, men flere studier fremhever hvor essensiell DC er. Intravital analyse identifiserte blant annet lunge-residerende CD103+ DC som direkte suppressor av metastatiske melanomceller, mens andre studier har vist at CD103+ DC har en kritisk rolle i tumorantigen presentasjon i transgenerisk og mus modeller av melanom og brystkreft (22).

Mellom 1995-2004 ble det utført flere kliniske studier i fase I, II og III, hvor de testet DC vaksiners evne til å initiere anti-tumor T celle effekt. Dette ga begrenset, men lovende resultat, spesielt i melanom og prostatakreft. En nyere fase II studie, med 39 melanom pasienter, viste at injisering av en intradermal DC vaksine kombinert med CTLA-4 blokade ga 8 fullstendige og 7 partielle terapeutiske responser. Nyere forskning har vist at tumorcellene i melanom, bryst og colorektale mus modeller hemmer DC rekrutering til tumorens mikromiljø ved å sekretere prostaglandin E2, som

hemmer tumor-assosierte NK celler, noe som resulterer i hemmet NK-avhengig DC rekruttering (22).

### **T celler**

T celler er en del av det ervervede immunsystemet, og arbeider som både organisatorer og som effektorer av immunitet. Avhengig av type stimuli/kontekst, kan T celler akkvirere funksjonell og effektor fenotype som virker direkte inflammatorisk eller anti-inflammatorisk. Som de nest mest tallrike immunceller i humanvev, er T celler svært godt studert i ulike kreftformer (26). Dersom det i tidlig fase produseres nok antigener vil naive T celler bli klargjort i lymfeknutene, for deretter å aktiveres og migrere til tumorens mikromiljø. Her vil de utføre en beskyttende effektor respons og eliminere de immunogenetiske kreftcellene. Flere studier viser dessuten at høye nivå av T lymfocytter korrelerer med mer fordelaktig prognose i melanom og bryst-, lunge-, prostata-, kolorektal-, renal- og gastrisk kreft (22).

CD8+ T celler er de mest prominente anti-tumor cellene. Når disse aktiveres av APC, vil de differensieres til cytotoksiske T lymfocytter (CTLs). Ved hjelp av eksosytose av perforin- og granzym-holdige granuler vil disse utføre en effektiv antitumor effekt ved direkte destruksjon av målcellene. CD4+ T hjelpeceller (TH-1), derimot, vil sekretere store mengder proinflammatoriske cytokiner som IL-2, TNF $\alpha$  og IFN $\gamma$ , som promoterer priming og aktivering av CTL, og aktivering av antitumor effektene av NK-celler og makrofager. På denne måten vil de øke presentasjon av antigener generelt. Det er dessuten blitt vist at tilstedeværelsen av CD8+ T celler og TH-1 celler i tumor korrelerer med mer gunstig prognose i form av bedre overlevelse og flere helbredelser i flere maligne tilstander (22).

Prekliniske studier viser at en rekke kreftceller utnytter de immunsupprimerende egenskapene til T celler og hemmer effektor funksjonen til anti-tumor T celler. De hemmer deres evne til å infiltrere tumor, overlevelse, proliferasjon og cytotoxicitet. T cellenes funksjon er avhengig av at tumorens antigener blir presentert ovenfor dem og setter i gang en immunrespons, og at det ikke er inhibitoriske signaler tilstede. Det er derfor logisk at de kreftcellene som er mer immunogene, blir gjenkjent og eliminert. De mindre immunogene cellene vil slippe unna og overleve. Denne prosessen kalles for kreft immun editering (27). De siste kreftcellene vil derfor få en immunresistent fenotype. Kreftcellene vil også underveis evolvere mekanismer som gjør dem i stand til å forhindre den lokale cytotoksiske responsen til både T celler, men også andre celler som TAM, TAN og NK celler (22).

En viktig mekanisme for perifer toleranse er regulering av effektor T-celle respons via immun sjekkpunkter på CTL og aktiverte CD4+ celler for å beskytte vevet mot inflammatoriske skader. To godt kjente sjekkpunkter er PD-1 og CTLA-4, som begge virker som negative regulatorer på T cellenes funksjon, og begge disse er blitt assosiert med immun unnvikelse i kreft. Over de siste årene har immun-sjekkpunkt inhibitorer som anti-PD-1, anti CTLA-4 og anti-PDL-1, med stor suksess, blitt brukt til å øke anti-tumor effekt av T celler i ulike krefttilstander. Etter hvert som tumoren vokser, vil TME endres og nye antigener vil presenteres. Tumor kontroll vil derfor kreve at T celler på nytt primes og aktiveres ut fra de nye antigenene. Kreftcellene bruker både en rekke immun sjekkpunkter, men også regulatoriske CD4+ celler (Tregs) til å hemme aktivering og cytotoxiciteten av disse. Tregs supprimerer aktivering og cytotoxiciteten til flere andre effektor immunceller, som andre T-celler, NK-celler, nøytrofile granulocytter og makrofager via både kontakt-avhengige mekanismer (ekspressjon av ulike cytokiner) og kontakt-uavhengige mekanismer (ved sekresjon av immunsupprimerende molekyler (22).

Ved metastasering vil CTL ha en anti-metastatisk effekt. Det er vist en motsatt korrelasjon mellom sirkulerende kreftceller og T-celler i den perifere blodbanen. Det er blant annet blitt rapportert at bruk av immun-sjekkpunkt inhibitorer forhindrer og behandler/reducerer metastasering til hjernen fra melanom og lungekreft. På den andre siden har høye nivåer av sirkulerende Tregs blitt assosiert med høyere i risiko for metastasering hos pasienter med ikke-småcellet lungekarsinom, brystkreft og en rekke andre kreftformer. Det trengs en del forskning for bedre å forstå mekanismene kreftceller bruker for å unngå T-celle angrep, slik at en kan utvikle behandlingsformer som hemmer de mekanismene og dermed forhindrer utvikling av kreft og metastasering (22).

### **B celler**

Vi vet en del om T cellene og deres rolle i utvikling og spredning av cancer, men det samme kan ikke sies om B cellene. Selv om tilstedeværelsen av B celler er blitt beskrevet i flere studier, er det svært lite vi vet om deres rolle i kreftprogresjon. Så langt peker funnene på at B celler promoterer og støtter tumorvekst. Det er blitt brukt flere mekanismer for å beskrive deres protumor rolle; immunsuppresjon via sekresjon av IL-10 og TNF $\alpha$ , til direkte stimulering av tumorcelleproliferasjon via B-cellederivert IL-35. Ved å avsette immunoglobuliner i TME vil B-celler også indirekte stimulere angiogenese. Det er usikkert hvor mange ulike fenotyper av B-celler som eksisterer i TME og om de kommer som immunsuppressorer eller om de blir reprogrammert i TME. Disse B-cellene kalles foreløpig for regulatoriske B celler på grunn av deres supprimerende

rolle, men det mangler spesifikke markører for å identifisere disse. Mer forskning er nødvendig for å få oversikt over og bedre forståelse av B cellenes rolle i utvikling og spredning av cancer (22).

### **Samspill mellom immunceller**

Mens det forskes en del på de ulike immuncellene, spesielt T celler, får samspillet mellom immuncellene i TME mye mindre oppmerksomhet. Det er økende bevis på at immunceller samarbeider om både å kontrollere og promotere tumorutviklingen. For eksempel vil NK celler sekretere CCL5 og XCL1 som promoterer rekruttering av DCs til TME. Dette vil resultere i økt priming og aktivering av anti-tumor T celler og øke den overordnede anti-tumor immun responsen (28). Det eksisterer også et samspill mellom NK-celler, effektor T celler og anti-tumor makrofager ved at de sekreterer TNF $\alpha$  og IFN $\gamma$ , som igjen øker differensiering av CTL, makrofagenes fagocytose, rekruttering av cytotoksiske cMET og forsterker den cytotoksiske evnen til NK. Også en rekke andre mekanismer beskriver samspillet mellom immuncellene og deres evne til å kontrollere utviklingen av tumorer. Ved å bedre forstå dette samspillet kan vi være i stand til å utvikle nye, mer effektive immunterapier (22).



## Konklusjon

Spredning av kreft skjer gjennom en rekke ulike mekanismer, og flere av disse er beskrevet i oppgaven. Ulike molekyler og signalveier bidrar til at muterte celler overlever, unngår immunsystemet og profilerer. Disse vokser og etter hvert går enkeltceller eller klynger av celler ut i blodbanen og etablerer seg på et nytt sted. Flere av disse cellene utvikler immunresistente fenotyper, og kan fortsette å utvikle seg uten å bli hindret av immunsystemet. Analyser av primære og sekundære/metastatiske tumorer viser også en stor genetisk, fenotypisk og antigen heterogenitet. Dette medfører at flere immunterapi mislyktes slik at tumoren får utviklet seg og sykdommen forverres. Dette utgjør en stor klinisk og teknologisk utfordring.

Utvikling og spredning av kreft er innviklet affære som involverer svært mange forskjellige molekyler, celler og mekanismer. Vi har god forståelse av hvordan enkelte mekanismer viker og bidrar til metastasering, men fordi mange av disse prosessene er essensielle for å opprettholde homeostase i kroppen, er det vanskelig å angripe disse uten at dette får alvorlige bivirkninger/konsekvenser. Andre emner er forsket på, men det mangler grundig forståelse og evidens før man kan bruke dette i klinisk sammenheng. Forskningen som er gjort så langt gir oss en pekepinn på hvilke emner det bør forskes mer på for å få en bedre forståelse av metastaseringsprosessen. Det er spesielt viktig å se på samspillet mellom ulike celler, da samarbeidet gjør det vanskeligere å kontrollere tumorvekst og metastasering ved kun å gå løs på en enkel celletype.

## Litteraturliste

1. Krefregisteret. Fakta om kreft [updated 2017. Available from: <https://www.krefregisteret.no/Generelt/Fakta-om-kreft/>.
2. Jin K, Li T, van Dam H, Zhou F, Zhang L. Molecular insights into tumour metastasis: tracing the dominant events. *The Journal of pathology*. 2017;241(5):567-77.
3. Nwabo Kamdje AH, Takam Kamga P, Tagne Simo R, Vecchio L, Seke Etet PF, Muller JM, et al. Developmental pathways associated with cancer metastasis: Notch, Wnt, and Hedgehog. *Cancer Biol Med*. 2017;14(2):109-20.
4. Weinberg RA. Kap. 2, 14. 2nd ed. ed. New York: Weinberg, Robert A.; 2014.
5. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 1998;392(6672):190-3.
6. Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol*. 2017;11(1):28-39.
7. Santamaria PG, Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. EMT: Present and future in clinical oncology. *Mol Oncol*. 2017;11(7):718-38.
8. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology*. 2000;2(2):76-83.
9. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature cell biology*. 2000;2(2):84-9.
10. Nieto MA, Cano A. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(5-6):361-8.
11. Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, Weinberg RA. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer metastasis reviews*. 2016;35(4):645-54.
12. Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Current opinion in cell biology*. 2016;43:7-13.
13. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016;166(1):21-45.
14. Liu T, Zhang X, Shang M, Zhang Y, Xia B, Niu M, et al. Dysregulated expression of Slug, vimentin, and E-cadherin correlates with poor clinical outcome in patients with basal-like breast cancer. *Journal of surgical oncology*. 2013;107(2):188-94.
15. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer research*. 2008;68(4):989-97.
16. Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nature medicine*. 2009;15(1):68-74.
17. Pandya P, Orgaz JL, Sanz-Moreno V. Modes of invasion during tumour dissemination. *Mol Oncol*. 2017;11(1):5-27.
18. Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration. *Current opinion in cell biology*. 2015;36:103-12.
19. Weinberg RA. Kap. 13. 2nd ed. ed. New York: Garland Science; 2014.
20. Merchant N, Nagaraju GP, Rajitha B, Lammata S, Jella KK, Buchwald ZS, et al. Matrix metalloproteinases: their functional role in lung cancer. *Carcinogenesis*. 2017;38(8):766-80.
21. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
22. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*. 2018;32(19-20):1267-84.
23. Nielsen SR, Schmid MC. Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. *Mediators of inflammation*. 2017;2017:9624760.
24. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-75.

25. Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, et al. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol.* 2014;122:91-128.
26. Speiser DE, Ho PC, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):599-611.
27. Teng MW, Galon J, Fridman WH, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3338-46.
28. Bottcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Bles H, Cabeza-Cabrero M, Sammicheli S, et al. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell.* 2018;172(5):1022-37 e14.