

Vrijwaringsclausule

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in deze masterproef.

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

ACADEMIEJAAR 2012-2013

**DE KANKERSTAMCELHYPOTHESE: DE HOND ALS MODEL VOOR BORSTKANKER
BIJ DE MENS**

door

Lindsey CANTILLON

Promotor: dierenarts Kevin Caestecker

Literatuurstudie in het kader

Copromotor: Prof. dr. Gerlinde Van de Walle

van de masterproef

Voorwoord

Bij het schrijven van deze literatuurstudie heb ik zowel professionele als morele steun gekregen van verschillende mensen, die ik hiervoor dan ook graag zou willen bedanken. Bedankt aan mijn promotor dierenarts Kevin Caestecker en copromotor Prof. dr. Gerlinde Van de Walle voor de goede begeleiding en de nuttige tips. Mijn ouders dank ik voor hun aanmoediging gedurende de volledige studie en om steeds in mij te blijven geloven, ook op momenten dat ik dat zelf niet deed.

INHOUDSOPGAVE

AFKORTINGENLIJST	1
SAMENVATTING	2
INLEIDING.....	3
LITERATUURSTUDIE	4
1. Diermodellen en carcinogenese: heden en toekomst.....	4
1.1. Het muismodel	4
1.2. Comparatieve oncologie: de hond	5
2. Kankerstemcellen.....	7
2.1. De kankerstemcelhypothese en de klinische implicaties	8
2.2. De origine van kankerstemcellen	8
3. Borstkankerstemcellen	9
3.1. Isolatie en karakterisatie.....	9
3.1.1. De gebruikte technieken	9
3.1.2. Humane borstkankerstemcellen	14
3.1.3. Caniene borstkankerstemcellen.....	14
3.2. Borstkankerstemcel gerelateerde pathways en genen	16
3.3. De heterogene borstkankerstemcelpopulatie.....	21
3.3.1. Borstkankerstemcellen en de oestrogeen receptor	21
3.3.2. Borstkankertypes en hun relatie tot merkerexpressie.....	22
BESPREKING	24
REFERENTIES.....	26

AFKORTINGENLIJST

ABC: ATP- Binding Cassette	HER2: human epidermal growth factor Receptor 2
Akt: murine thymoma viral oncogene homolog1	HIF-1: hypoxia-inducible factor
ALDH1: aldehyde dehydrogenase	HRT: hormonale vervangingstherapie
APC: adenomatous polyposis coli	LRP: lipoproteïne-receptor-gerelateerde proteïnen
ARF: ADP-ribosylatie factor	MACS: magnetic-activated cell sorting
BAA: Bodipy TM -aminoacetaldehyde	MMS: mammosferen
BAAA: Bodipy TM -aminoacetaat	PI3K: fosfoinositide 3-kinase
BCSC: borstkankerstemcellen	PIP2: fosfatidylinositol-bifosfaat
BRCA: breast cancer susceptibilty gene	PIP3: fosfatidylinositol-trifosfaat
CK: cytokeratine	PKA: farmacokinetisch
CK1: caseïne kinase	PKD: farmacodynamisch
CSC: kankerstemcellen	PR: progesteronreceptor
CXCL12: chemokineligand 12	Ptc: Patched
CXCR4: chemokinereceptor 4	PTEN: fosfatase en tensine homolog
DCIS: ductaal carcinoma in situ	RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
DEAB: diethylamino-benzaldehyde	Sca-1: stamcel antigen-1
DKK: dickkopf	SCID: Severe Combined Immundeficient
DMEM: dulbecco's modified eagle medium	SERMs: selective estrogen receptor modifiers
DSL: delta/serrate/lag-2	SHH: sonic hedgehog
ER: oestrogenreceptor	Smo: Smoothened
ESA: epitheliaal specifiek antigen	SP: side population
ESR: Oestrogenreceptor	TF: transcriptiefactor
FACS: fluorescent-activated cell sorting	VEGF: vascular endothelial growth factor
FASL: fas Ligand	Wnt: Wingless
FOXP1: forkhead box N1	
Fz: frizzled	
GEMs: genetically engineered mice	
GSK3: glycogeen synthase kinase 3	

SAMENVATTING

In het verleden zijn er al verschillende theorieën aangehaald met betrekking tot de mogelijke oorsprong van kanker. Eén van de theorieën die veel aandacht krijgt is de kankerstemcelhypothese. Volgens deze hypothese bestaat een tumor uit een heterogene celpopulatie met een groot aantal gedifferentieerde cellen en een klein aantal kankerstemcellen (CSC) die in staat zijn tot zelfvernieuwing en differentiatie. Deze CSC zijn resistenter aan de huidige therapieën dan de overige cellen die deel uitmaken van de tumor, en zijn dus verantwoordelijk voor herval na een schijnbaar succesvolle therapie. Om nieuwe therapieën te kunnen ontwikkelen die doelgericht deze CSC aanvallen is het noodzakelijk deze cellen te isoleren, te karakteriseren en factoren die hun functie beïnvloeden, te identificeren. Om dit te kunnen verwezenlijken is er nood aan een diermodel dat zo nauw mogelijk aansluit bij de mens op gebied van de verschillende aspecten van tumorbiologie. Huidig kankeronderzoek maakt voornamelijk gebruik van muismodellen waarbij tumoren hetzij geïnduceerd worden door middel van genetische manipulatie, hetzij geïmplantéerd worden. Bijgevolg wijken deze geïnduceerde tumoren sterk af van de spontaan optredende tumoren die voorkomen bij de mens. De hoge incidentie van melkkliertumoren bij de hond en de vele gelijkenissen tussen humane en caniene melkkliertumoren maken de hond een potentieel krachtig diermodel voor humane borstkanker. Het isoleren van borstkankerstemcellen (BCSC) kan zowel voor humane als caniene melkkliertumoren via het sfeervormingsprotocol. Sferen gevormd door CSC zouden, in tegenstelling tot normale stamcellen, eindeloos moeten kunnen vernieuwen zonder hun proliferatie en differentiatiecapaciteit te verliezen. Voor de karakterisatie van BCSC wordt gebruik gemaakt van exclusietesten en immunofenotypering. Humane BCSC vertonen een $CD44^+/CD24^{-/Low}/CD49f^+/Sox2^+/Oct-4^+/ABCG2^+/ALDH1^+/ESA^+/CXCR4^+/Lin^-$ fenotype en caniene BCSC een $CD44^+/CD24^{-/Low}/CD34^+/CD10^{low}/CD133^+/CD49f^+/Sox2^+/Oct-4^+/ABCG2^+$ fenotype. Naast deze karakterisatie is het ook belangrijk inzicht te verwerven omtrent de verschillende pathways en genen gerelateerd aan deze BCSC om het ontstaan ervan te ontrafelen en eventueel toekomstige therapieën hierop te laten ingrijpen. Het expressiepatroon van vele pathways vertoont opvallende gelijkenissen tussen beide species, maar vooral wat betreft caniene melkkliertumoren is de informatie hierover nog zeer beperkt.

INLEIDING

Vragen omtrent humane carcinogenese, zoals de mogelijke oorsprong van de getransformeerde cel en de onderliggende moleculaire basis van de maligne transformatie, blijven vaak onbeantwoord. Daarom is er nood aan geschikte diermodellen die op verschillende aspecten van tumorbiologie zo dicht mogelijk aansluiten bij de biologie van humane tumoren. Spontaan optredende caniene melkkliertumoren vertonen vele gelijkenissen met humane mammatumoren wat betreft tumorbiologie, epidemiologie en klinische eigenschappen en bieden eveneens belangrijke voordelen ten opzichte van de muismodellen, waarbij melkkliertumoren geïnduceerd moeten worden. Deze literatuurstudie heeft tot doel na te gaan of de hond, in de visie van de kankerstemcelhypothese, een goed model kan zijn voor borstkanker bij de mens. Dit zou inhouden dat de kankerstemcellen van humane en caniene melkkliertumoren dezelfde eigenschappen bezitten en op dezelfde manier, namelijk door dezelfde pathways worden beïnvloed. Om erachter te komen of dat inderdaad zo is, is het noodzakelijk zowel de humane als de caniene kankerstemcellen correct te isoleren en te karakteriseren en de mechanismen die aan de basis liggen van hun ontstaan en hun functie beïnvloeden, te achterhalen. Hoe meer men hierin slaagt, des te beter nieuwe therapieën specifiek gericht kunnen worden tegen deze hardnekkige kankerstemcellen. Blijkt de hond een goed model te zijn, dan bestaat de mogelijkheid het caniene model te integreren in de ontwikkeling van humane kankertherapeutica.

LITERATUURSTUDIE

1. Diermodellen en carcinogenese: heden en toekomst.

De relevantie van een diermodel om carcinogenese bij de mens te bestuderen hangt af van de gelijkenissen tussen tumoren van de voorgestelde diersoort en humane tumoren op gebied van histologie, fysiologie, pathways, metastatisch patroon en de respons op therapie¹.

1.1. *Het muismodel*

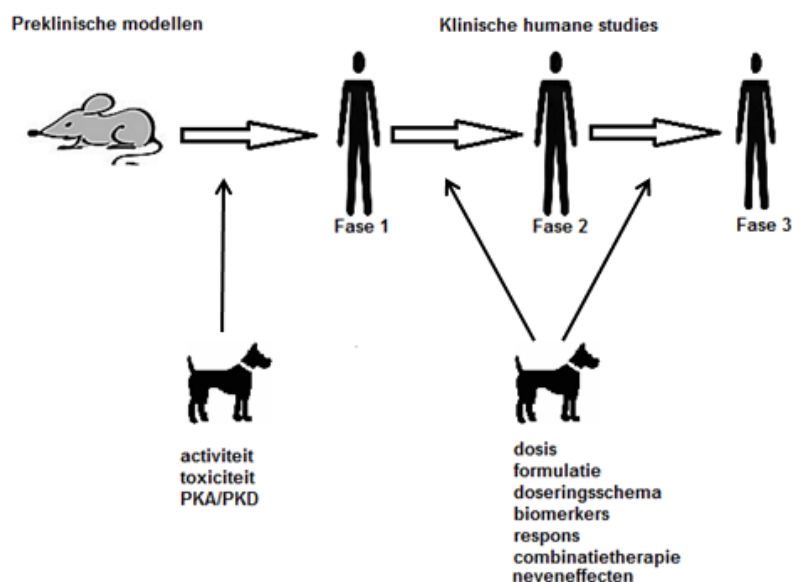
Het gebruik van muismodellen heeft veel bijgedragen tot het begrijpen van de tumorbiologie maar heeft anderzijds ook veel gebreken blootgelegd die een verdere vooruitgang in kankeronderzoek verhinderen. Deze modellen zijn dan ook niet te vergelijken met natuurlijk voorkomende tumoren die ontstaan uit 1 cel door accumulatie van DNA schade en deregulatie van genen. De maligne transformatie van humane cellen verloopt grotendeels anders dan deze van muriene cellen. Een klassiek voorbeeld hiervan is de rol van telomerase in het onsterfelijk worden van cellen. Een telomeer is een kort stukje DNA aan het uiteinde van een chromosoom dat bij elke celdeling korter wordt. Wanneer een telomeer door het inkorten uiteindelijk is verdwenen, stopt de celdeling en ondergaat de cel senescentie. Telomerase is een reverse transcriptase enzym dat in staat is telomeren te verlengen, waardoor cellen aan senescentie ontsnappen en oneindig kunnen prolifereren. Muriene cellen brengen telomerase constitutief tot expressie, dit in tegenstelling tot humane cellen waar de repressie van telomerase actief moet beëindigd worden om onsterfelijkheid te bekomen^{2,3}.

De meest gebruikte muismodellen voor het bestuderen van carcinogenese zijn Genetically Engineered Mice (GEMs) of zogenaamde knock-out muizen en xenotransplantatie modellen. In het eerste model gaat men gericht mutaties aanbrengen in een gen of een gen uitschakelen en het effect ervan nagaan. Dit model is vooral nuttig voor het bestuderen van tumorinitiatie, maar schiet tekort in andere fasen van carcinogenese. Zo zal inactivatie van een gen in alle cellen plaatsvinden, waardoor de initiële stadia van humane tumorgenese niet optreden. Bovendien ontwikkelen knock-out muizen vaak andere tumoren vergeleken met mensen met dezelfde mutatie. Bijvoorbeeld zal het invoeren van mutaties in *Breast Cancer susceptibility gene 1 (BRCA1)* en *2 (BRCA2)* in muizen geen ontwikkeling van tumoren geven terwijl dit bij de mens sterk gerelateerd is met borst- en ovariumcarcinomen. Bij het xenotransplantatiemodel wordt een humane tumor geïmplant in een immuungecompromitteerde muis. Men spreekt van naakte muizen wanneer er een deletie werd aangebracht in het *Forkhead Box N1 (FOXN1)* gen, wat resulteert in naakte, athymische muizen die niet in staat zijn T-lymfocyten te produceren. Daarnaast bestaan er nog de 'Severe Combined Immundeficient' (SCID) muizen, waarin zowel de B als T-lymfocyten ontbreken. Door het ontbreken van deze lymfocyten is de afstotingsreacties van beide soorten muizen gelimiteerd waardoor de humane tumor kan groeien en de tumorbiologie van humane tumoren kan bestudeerd worden. De tumoren kunnen heterotopisch (subcutaan) of orthotopisch (in het orgaan waar de tumor zich ontwikkelt) worden geïmplant. Het grote nadeel van dit model is dat de rol van het immuunsysteem in tumorprogressie niet kan bestudeerd worden^{2,4,5}.

Een ander aandachtspunt bij het gebruik van diermodellen is dat therapieën, efficiënt in muismodellen, vaak falen in de humane geneeskunde door een onacceptabele toxiciteit of gebrek aan efficiëntie, wat vooral te wijten is aan de heterotopische implantatie en de onmogelijkheid tot metastasering in deze modellen. Metastasen reageren immers anders op therapie dan de primaire tumor en zijn in de humane oncologie van groot prognostisch belang. Enkel het orthotopisch xenotransplantatiemodel vormt hierop een uitzondering². In dit model is er wel degelijk metastase mogelijk. Ook het doel van de therapie verschilt, aangezien aan labodieren de dosis wordt gegeven die het te wensen effect uitlokt in tegenstelling tot humane patiënten waar een conservatieve dosis gegeven wordt om de neveneffecten te minimaliseren. Deze factoren samen maken geneesmiddelontwikkeling inefficiënt en duur^{2,3}.

1.2. Comparatieve oncologie: de hond

De huidige humane geneesmiddelontwikkeling volgt een sterk afgebakend pad dat begint met *in vivo* en *in vitro* preklinische effectiviteits- en veiligheidsstudies zoals bijvoorbeeld het evalueren van de toxiciteit van het geneesmiddel. Vervolgens starten humane klinische testen die verder onderverdeeld worden in 3 fasen. In de eerste fase wordt het geneesmiddel getest op gezonde individuen om de farmacokinetische (PKA) en farmacodynamische (PKD) parameters te onderzoeken evenals mogelijke toxiciteit en neveneffecten. Fase 2 studies gaan door op een klein aantal streng geselecteerde patiënten. Voor het eerst kan nu de effectiviteit van het geneesmiddel worden onderzocht evenals mogelijke geneesmiddelinteracties. Fase 3 vindt plaats op een groot aantal, meer variabele patiënten en is doorslaggevend voor het wel dan niet in productie komen van een geneesmiddel⁶. Door de integratie van het caniene model (Figuur 1) als een intermediair tussen preklinische en humane klinische studies is het mogelijk belangrijke parameters te evolueren alvorens men start met de humane klinische studies.



Figuur 1: De integratie van studies op honden in de humane klinische geneesmiddelontwikkeling (naar Paoloni & Khanna, 2008; Pang & Argyle, 2009)^{1,3}.

Omdat er geen vast protocol is voor het behandelen van honden die lijden aan kanker, is er een mogelijkheid om nieuwe kankertherapieën te evalueren in minder ver gevorderde stadia van de ziekte

en in populaties die nog geen eerdere behandeling hebben ondergaan. Dit heeft als voordeel dat een nieuwe therapie, in een vroeg stadium van de ontwikkeling, zowel afzonderlijk als in combinatie met andere therapieën kan beoordeeld worden¹.

Men moet zich echter wel realiseren dat integratie van het caniene model niet mogelijk zal zijn voor ieder humane geneesmiddel of iedere humane ziekte. Om meer inzicht te verkrijgen omtrent de relevantie van het caniene model in de ontwikkeling van nieuwe kankertherapieën kan men zich richten tot de comparatieve oncologie. Comparatieve oncologie beschrijft een discipline die de studie van natuurlijk voorkomende kankers in dieren integreert in humane kankerbiologie en –therapie. Caniene tumoren ontstaan spontaan, met een hoge incidentie, en in de context van een intact immuunsysteem waarin tumor, gastheer en tumoromgeving compatibel zijn^{1,3} (Tabel 1). Tumorinitiatie en tumorprogressie worden in beide species beïnvloed door dezelfde factoren zijnde leeftijd, voeding, geslacht, reproductiestatus en omgevingsinvloeden zoals passief roken, luchtvervuiling en pesticiden^{3,7,8}. Interessant is dat langs de ene kant tumorprogressie relatief snel gaat bij de hond, wat toe laat vragen hieromtrent binnen een korte tijdspanne te beantwoorden, maar langs de andere kant lang genoeg duurt om de efficiëntie van nieuwe therapieën te evalueren⁸. Diverse soorten humane tumoren komen ook voor bij de hond en vertonen een gelijkaardig biologisch gedrag, ook voor wat betreft metastase en angiogenese^{1,3}. Deze gelijkenissen kunnen bijkomend worden bevestigd door de recente (2005) ontcijfering van het caniene genoom. Hieruit blijkt dat er vaak eenzelfde moleculaire basis is voor het ontstaan van humane en caniene tumoren^{1,3,9}. De genetische diversiteit van een hondenpopulatie met een specifiek type kanker weerspiegelt de genetische diversiteit in de humane populatie ('outbred'), dit in tegenstelling tot onderzoek op muizen waar gebruik wordt gemaakt van ingeteelde lijnen ('inbred')¹. Een ander voordeel is de hoge gastro-intestinale gevoeligheid voor zowel oraal toegediende medicatie als therapieën die de chemoreceptor trigger zone stimuleren waardoor de hond eveneens kan dienen als model voor het testen van anti-emetische profylaxis^{1,10}.

Tabel 1: Samenvattende tabel van de gelijkenissen tussen humane en caniene oncologie.

<i>Eigenschap</i>	<i>Opmerking</i>	<i>Referentie</i>
Incidentie	De verhoogde levensverwachting van honden dankzij vaccinatie en betere veterinaire zorgen heeft geleid tot een hoge incidentie van ouderdomsgerelateerde ziekten zoals kanker ³ .	3
Ontstaan	Spontaan en in de context van een intact immuunsysteem.	1,3
Biologisch gedrag	Angiogenese, metastasering.	3
Moleculaire basis	Er is vaak eenzelfde genetische basis voor het ontstaan van een bepaalde soort tumor.	1,3,9
Histologie	Diverse soorten humane tumoren komen ook voor bij de hond.	1,3
Beïnvloedende factoren	Leeftijd, voeding, geslacht, reproductiestatus, omgevingsinvloeden.	3,7,8
Genetische diversiteit	Genetische diversiteit van een hondenpopulatie met een bepaalde type kanker weerspiegelt de genetische diversiteit in de humane populatie ('outbred')	1

Meer specifiek, zijn er op gebied van melkkliertumoren opvallende gelijkenissen tussen hond en mens^{11,12}. Zo is borstkanker de meest voorkomende neoplasie zowel in vrouwen als in teven en is het meest voorkomende type niet-invasieve borstkanker het Ductaal Carcinoma In Situ (DCIS). De ontwikkeling van de tumoren is hormoonafhankelijk en obesitas en veroudering zijn belangrijke risicofactoren voor het ontstaan ervan. Metastasering gebeurt hoofdzakelijk lymfogeen, maar kan ook hematogeen. Het metastatisch patroon (lymfeknopen, longen, lever, botten en hersenen) is gelijkaardig voor beide species met uitzondering dat metastasen in de lever en het skelet minder frequent voorkomen in teven. Bepaalde prognostische factoren gebruikt bij de mens gelden ook voor caniene melkkliertumoren zoals bv. een slechte prognose voor Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2)-positieve borstkankers. Lymfeknoop metastasen vormen een belangrijk gegeven voor het inschatten van de prognose van patiënten met borstkanker. In de diergeneeskunde wordt er voorlopig nog geen rekening gehouden met lymfeknoopmetastasen, niettegenstaande dit wel belangrijk kan zijn. Borstkanker komt duidelijk meer voor in bepaalde families en het is geweten dat er een genetische predispositie bestaat. Dit geldt ook voor de hond, waar er een hogere incidentie is aan melkkliertumoren in bepaalde rassen zoals onder andere de engelse springer spaniel, de duitse herder, de boxer en de doberman¹³. Het bestuderen van deze rassen kan een strategie zijn in het identificeren en bestuderen van kankergerelateerde genen zoals *BRCA1* en *BRCA2*^{1,13}.

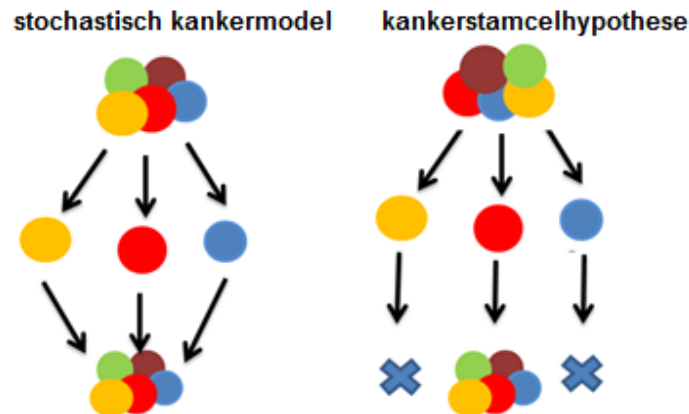
2. Kankerstemcellen

2.1. De kankerstemcelhypothese en de klinische implicaties

Adulte stamcellen spelen zowel een rol in weefselherstel- en onderhoud als in maligne transformaties. Stamcellen hebben drie kenmerkende eigenschappen: **1)** ze zijn in staat tot zelfvernieuwing, **2)** ze kunnen aanleiding geven tot alle gedifferentieerde cellen behorende tot het desbetreffende weefsel (= multipotent) en **3)** homeostatische controle, de mogelijkheid om differentiatie en zelfvernieuwing te reguleren onafhankelijk van de omgevingsstimuli¹⁴.

Doordat stamcellen langlevende cellen zijn, vergroot de kans op mutatie waardoor ze gevoeliger zijn voor maligne transformatie dan andere, gedifferentieerde cellen, die na een beperkte levensduur sterven en worden vervangen¹⁵. Vaak ziet men dat moleculaire pathways die een kritische rol spelen in zelfvernieuwing gedereguleerd zijn in tumoren waardoor de mutante stamcel of CSC ongecontroleerd gaat delen en differentiëren^{15,16,17}. Deze deling kan symmetrisch of asymmetrisch zijn. Vindt er een symmetrische deling plaats ontstaan er 2 nieuwe CSC, waardoor de kankerstemcelpool toeneemt. Deelt de CSC asymmetrisch dan ontstaat er één CSC en één kankercel die verder differentieert. Dit resulteert in een tumor bestaande uit een heterogene populatie van cellen waarin de oorspronkelijke weefselhiërarchie ten dele bewaard blijft¹⁴. Binnen deze heterogene populatie bevinden zich een groot aantal gedifferentieerde cellen die de bulk van de tumor uitmaken en een klein aantal CSC die in staat zijn zichzelf te vernieuwen. Deze heterogeniteit is één van de argumenten waarop de kankerstemceltheorie of het 'hiërarchisch model' (Figuur 2) gebaseerd is¹⁴. Een tweede argument is gebaseerd op studies die hebben aangetoond dat er een grote hoeveelheid kankercellen nodig zijn om tot een tumor te komen¹⁹. Deze argumenten staan sterk in contrast met het stochastisch model (Figuur 2) waarin gezegd wordt dat elke kankercel gelijk is en het potentieel heeft

om een nieuwe tumor te vormen, maar het gedrag van de kankercellen beïnvloed wordt door intrinsieke (transcriptiefactoren, signalling pathways,...) en extrinsieke factoren (micro-omgeving, immuunrespons,...). Deze invloeden zijn onvoorspelbaar en resulteren in heterogeniteit in celmerkers, intreden van de celcyclus en tumorinitiatiecapaciteit. De tumorinitierende activiteit kan dus volgens dit model niet worden verrijkt door cellen te sorteren op basis van intrinsieke factoren, dit in tegenstelling met het hiërarchisch model²⁰.



Figuur 2: Vergelijkende figuur van het stochastisch kankermodel en de kankerstemcelhypothese (naar Tataria et al., 2006)¹⁸.

Het bewijs dat vele kankers gedreven worden door CSC heeft belangrijke klinische implicaties¹⁴. Huidige therapieën hebben een werking gebaseerd op het feit dat elke kankercel hetzelfde kwaadaardig potentieel heeft. Deze therapieën missen dus aan specificiteit naar de CSC toe waardoor ze de tumor wel doen krimpen maar vaak falen om de CSC te vernietigen of soms de CSC zelfs een groeivoordeel geven ten opzichte van andere cellen. Dit is mogelijk doordat CSC vaak veel resistenter zijn tegen therapieën en daardoor de meerderheid van de tumor gaan uitmaken²⁴. Mogelijke oorzaken van deze resistentie zijn onder andere het verhoogd tot expressie brengen van ABC-transporteiwitten waardoor bepaalde farmaca beter uit de cel gepompt kunnen worden, verhoogde expressie van anti-apoptotische proteïnen en de resistentie tegenover DNA schade. Door de therapieën specifiek te richten op CSC (en dus normale stamcellen ongedeed te laten) zullen deze minder toxisch zijn en tegelijkertijd effectiever. Om dit te verwezenlijken is het uiterst belangrijk CSC correct te isoleren en karakteriseren, om pathways betrokken in deze kankerstemcelfuncties te bestuderen en nieuwe therapieën hierop af te stemmen¹⁴.

2.2. De origine van kankerstemcellen

Het woord CSC verwijst naar een functie en niet naar de identiteit van de initieel misvormde cel¹⁹. De exacte oorsprong van CSC is tot op heden nog niet duidelijk. Er zijn 2 mogelijkheden: 1) CSC zijn normale stamcellen die mutaties hebben ondergaan waardoor de cel ongecontroleerd gaat delen of 2) CSC zijn progenitorcellen die aan stamcelkarakteristieken hebben gewonnen door mutatie en dedifferentiatie²¹. Waarschijnlijk zijn beide gevallen mogelijk en is het ontstaan afhankelijk van welke mutaties er juist plaatsgevonden hebben en welke interacties er zijn met de omgeving of 'niche'^{3,15}.

Deze niche speelt een kritische rol in het reguleren van de proliferatieratio, in het oriënteren van de delende stamcellen naar een symmetrische of asymmetrische deling en in de bescherming van stamcellen tegen celdood. De mediators die voor deze communicatie instaan bestaan uit oppervlakte receptoren en oplosbare factoren. Het interessante hieraan is, dat het vaak net deze moleculen zijn die betrokken zijn in tumorontwikkeling. Maar de rollen kunnen ook omgekeerd zijn. Stamcellen kunnen een invloed hebben op de niche en zo hun eigen micro-omgeving creëren. Een welbekend voorbeeld hiervan binnen de tumorgenese is neo-angiogenese. Hieronder verstaat men de vorming van nieuwe bloedvaten uitgaande van het reeds bestaande vasculair netwerk, wat essentieel is voor tumorgroei en metastase²². Het bestuderen van een tumor zou dus altijd moeten gebeuren in de context van de niche.

3. Borstkankerstemcellen

3.1. *Isolatie en karakterisatie borstkankerstemcellen*

3.1.1. De gebruikte technieken

A. Isolatie door middel van het sfeervormingsprotocol

De isolatie van borstkankerstemcellen (BCSC) kan op dezelfde manier gebeuren als deze van normale melkklierstemcellen²³. Men kan zowel uitgaan van cellijnen, als van weefsel bekomen door biopsie. Men brengt de cellen in cultuur en dissocieert ze zodat een enkelvoudige celsuspensie bekomen wordt. Vervolgens wordt deze suspensie overgeënt op een ultra-low attachment (non-adherente) plaat in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), arm aan serum en aangereikt met groeifactoren²³. Deze condities laten geen adherentie toe waardoor de meeste cellen anoïkis ondergaan²⁵. Dit is een vorm van geprogrammeerde celdood die geïnduceerd wordt door contactverlies met de extracellulaire matrix. Slechts enkele cellen zullen overleven, prolifereren en sferen gaan vormen, waaronder stemcellen en vroege progenitorcellen²³. De overenting moet gebeuren aan een optimale dichtheid (meestal tussen 200 en 600 cellen/cm²), dit is een dichtheid die enerzijds hoog genoeg is om een verandering in het aantal mammosferen (MMS) te kunnen kwantificeren en anderzijds laag genoeg is om aggregatie, en dus een onderschatting van het aantal MMS, te voorkomen¹³. Men neemt aan dat elke sfeer ongeveer één cel bevat die zelfvernieuwing kan ondergaan. Deze sferen worden geteld door middel van een omgekeerde microscoop. Aan de hand hiervan kan de sfeervorming efficiëntie berekend worden¹³:

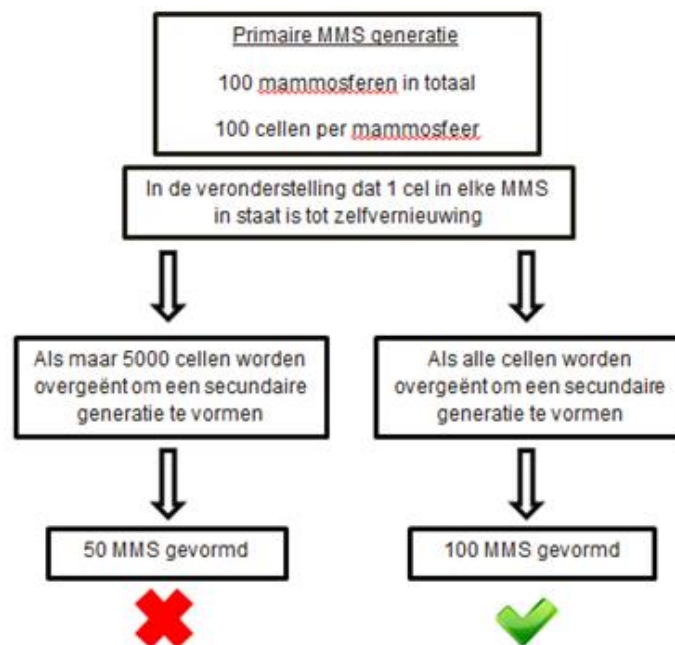
$$\frac{\text{aantal sferen per well}}{\text{aantal geplante cellen per well}}$$

De sferen kunnen daarna overgeënt worden op adherente platen in een standaard medium om de capaciteit om een normale monolayer te vormen, na te gaan. Nadien kunnen de cellen weer overgeënt worden naar non-adherente platen om opnieuw sferen te vormen. Deze manier van werken bevordert het stemcelfenotype²⁷.

Na de 2^{de} passage kan men de zelfvernieuwingsratio berekenen door:

$$\frac{\text{aantal sferen gevormd tijdens tweede passage}}{\text{aantal sferen gevormd tijdens eerste passage}}$$

Het is belangrijk dat bij elke passage elke cel uit de sfeer overgeënt wordt, gebeurt dit niet dan zal de zelfvernieuwingsratio niet kloppen (Figuur 3). Het overenten zou telkens moeten gebeuren met dezelfde densiteit als de primaire enting, maar tellen is niet altijd mogelijk bij klinische gevallen waar slechts een klein aantal cellen beschikbaar zijn. Daarom neemt men aan dat elke sfeer ongeveer 100 cellen bevat. Deze passages zouden minimum 5x herhaald moeten worden om zo het kankerstamcelfenotype te bevorderen. Sferen gevormd door CSC zouden eindelijk moeten kunnen vernieuwen zonder hun proliferatie en differentiatie capaciteit te verliezen²⁷, dit in tegenstelling tot sferen gevormd door normale stamcellen, die in cultuur slechts een beperkte vernieuwingscapaciteit bezitten²⁵.



Figuur 3: De noodzaak om alle cellen afkomstig van primaire mammaosferen (MMS) tijdens de passage over te enten (naar Shaw, 2012)²⁶.

De analyse en interpretatie van de gegevens moet met voorzichtigheid gebeuren. Het sfeervormingsprotocol zal bijvoorbeeld geen rustende CSC detecteren en sommige sferen kunnen ontstaan uit progenitorcellen die *in vivo* geen tumor kunnen doen ontstaan²⁶. Daarom is er altijd een extra verificatiestap nodig om het *in vivo* tumorvormend potentieel van de geïsoleerde cellen te bewijzen. Dit doet men aan de hand van een xenotransplantatieprotocol waarbij de sferen geïnjecteerd worden in immuungecompromitteerde muizen. Omdat het in cultuur brengen van cellen het biologisch gedrag van cellen kan beïnvloeden zou men de cellen met hetzelfde fenotype bekomen als door het sfeervormingsprotocol, rechtstreeks moeten injecteren in immuungecompromitteerde muizen zonder deze alvorens in cultuur te brengen²⁸.

B. Karakterisatie door middel van Fluorescent-activated cell sorting

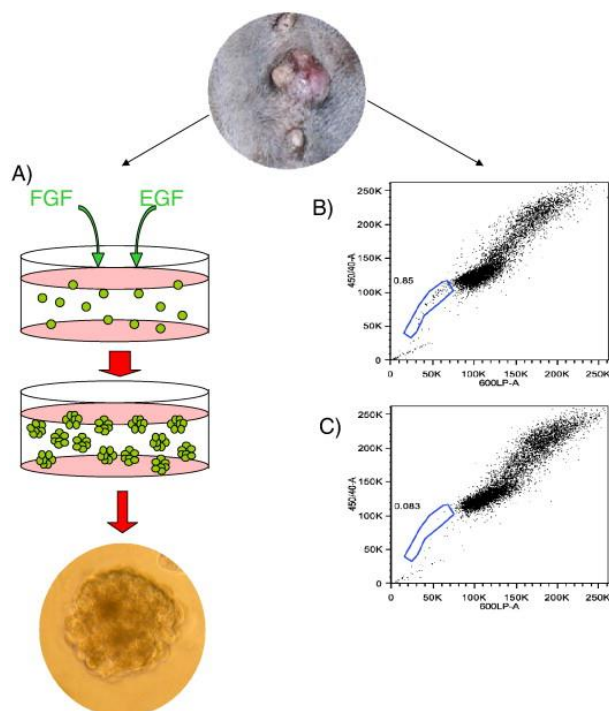
Het doel van het karakteriseren is om de CSC een bepaalde identiteit te kunnen geven. Er bestaan verschillende manieren om CSC te karakteriseren zoals Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR), Western blot (WB), Magnetic-activated cell sorting (MACS), immunohistochemie (IHC) en fluorescent-activated cell sorting (FACS). Enkel op dit laatste zal in deze mastergroep dieper worden ingegaan. Met FACS kunnen immers verschillende “karakteristieken” worden bestudeerd en deze techniek is een gespecialiseerd type van flow cytometrie waarbij een mix van heterogene cellen gescheiden wordt op basis van hun specifieke fluorescentie.

**Immunofenotypering*

Immunofenotypering is een structurele methode die de expressie van celoppervlaktemerkers opspoorde door gebruik te maken van antilichamen en ze op basis daarvan sorteert. Na het sorteren worden de mogelijke CSC getest op *in vivo* tumorvormende capaciteit in een xenotransplantatie protocol¹⁹. Fabian en collega's²⁸ stelden echter de betrouwbaarheid van deze merkers in vraag. CSC zijn namelijk instabiele cellen die hun fenotype kunnen wijzigen als respons op veranderingen in de micro-omgeving. Ook bepaalde experimentele omstandigheden zoals enzymatische digestie, kunnen de merkerexpressie beïnvloeden. Daarom moeten de resultaten van immunofenotypering altijd gecorreleerd worden met een functionele karakterisatie (side population analyse, aldehyde dehydrogenase 1 activiteit)²⁹. Wanneer men dit doet ziet men dat verschillende methoden verschillende cellen identificeren als zijnde CSC, wat wijst in de richting van het bestaan van een heterogene CSC populatie.

**Side population analyse*

De side population (SP) analyse is een functionele methode die de capaciteit van cellen evalueert om een fluorescente kleurstof, zoals Hoechst₃₃₃₄₂, te excluseren¹⁹. Cellen die een verhoogde expressie vertonen van het ATP-binding cassette (ABC) transporteiwit 'ABCG2', kunnen zowel deze DNA bindende kleurstof als bepaalde geneesmiddelen beter excluseren. Deze SP cellen kunnen opgespoord worden door flow cytometrie en zullen dus Hoechst-negatief zijn. Wanneer men inhibitoren van deze membraantransportproteïnen toevoegt, zoals bv. Verapamil, zal deze zijpopulatie verdwijnen (Figuur 4). Deze SP cellen blijken stamceleigenschappen te bezitten: ze zijn in staat tot zelfvernieuwing, kunnen asymmetrische deling ondergaan en brengen bepaalde stamcelmerkers tot expressie. De exclusietest kan dus gebruikt worden om CSC op te sporen. Aangezien het transporteiwit ABCG2 betrokken is in chemoresistentie, is het combineren van chemotherapie met inhibitoren van membraantransporters dus een veelbelovende therapie¹⁹.



Figuur 4: Isolatie van kankerstemcellen (CSC) door middel van het sfeervormingsprotocol en Fluorescent-activated cell sorting (FACS). (A) een cel van een cellijn/klinisch geval wordt in cultuur gebracht onder niet-adherente cultuur condities. Sferen vormen zich na 7-10 dagen en brengen bepaalde stamcelmerkers tot expressie. (B) het gebruik van FACS om de Side Population (SP) cellen te identificeren. (C) Na het toevoegen van Verapamil verdwijnen de SP cellen (uit Pang & Argyle, 2009)³.

**Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 1 activiteit*

ALDH1 is een enzyme dat de oxidatie katalyseert van retinol naar retinolzuur in normale en maligne stamcellen. Dit enzym zou cruciaal zijn voor de levensverwachting van stamcellen en de resistentie van CSC aan chemotherapeutica die werken via toxische aldehyd intermediären zoals Cisplatin. Cellen met ALDH1 activiteit kunnen gedetecteerd worden door gebruik te maken van het fluorochroom BodipyTM-aminoacetaldehyde (BAAA). Intracellulair ALDH1 zet BAAA om tot het fluorescerend BodipyTM-aminoacetaat (BAA). BAA komt vast te zitten in de cel aangezien het negatief geladen is, en de exclusie doorheen ABC-transporters geblokkeerd wordt door inhibitoren. Het resultaat wordt vergeleken met cellen behandeld met de ALDH inhibitor diethylamino-benzaldehyde (DEAB). Omdat de expressie van ALDH1 gewijzigd wordt door chemotherapie is het gebruik ervan als enkelvoudige merker gelimiteerd³⁰.

**De combinatie van SP analyse, ALDH1 en immunofenotypering*

Het afzonderlijk gebruik van elk van de voorgaande methoden heeft zijn beperkingen, maar het gebruik ervan in combinatie met elkaar kan een groot voordeel opleveren. Om dit te kunnen realiseren is het nodig de verschillende procedures op elkaar af te stemmen, wat niet eenvoudig blijkt te zijn³⁰. Bv. : in het ALDH1 protocol wordt gebruik gemaakt van kanaalinhibitoren (Verapamil) welke de efflux van BAAA voorkomen. Tegelijkertijd zorgt dit voor een inhibitie van het SP protocol. Om deze problemen te voorkomen wordt aangeraden eerst het SP protocol uit te voeren alvorens het ALDH1 protocol en in de laatste stap de oppervlakte merkers te identificeren³¹.

3.1.2. Humane borstkankerstamcellen

Het bewijs voor het bestaan van CSC werd voor het eerst geleverd voor humane myelogene leukemie³², later werden CSC ook geïdentificeerd in een solide tumor, namelijk een melkkliertumor³³. Dit deed men door gebruik te maken van een model waarbij men humane borstkankercellen ging inplanten in het melkkliervetkussen ('fat pad') van SCID muizen dat ontdaan was van epitheliaal melkklierweefsel. Na een eerste passage ging men de cellen sorteren door middel van flow cytometrie op basis van oppervlakte markers en met elke subpopulatie werden verdere passages uitgevoerd. Er werd gebruik gemaakt van de markers CD44 (een transmembraanglycoproteïne) CD24 (een sialoglycoproteïne), ESA (een epitheliaal specifiek antigen) en Lineage (Lin) markers. Lineage markers zijn een combinatie van markers (CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31, CD64, CD140b)³³ die gebruikt worden om gedifferentieerde hematopoëtische cellen te identificeren. Men kwam tot de conclusie dat enkel een bepaalde subpopulatie van cellen in staat was nieuwe tumoren te vormen. Deze cellen werden gedefinieerd als zijnde CD44⁺CD24^{-/low}Lin⁻. Enkele honderden cellen met dit fenotype waren in staat nieuwe tumoren te vormen terwijl duizenden cellen met een ander fenotype hier niet toe in staat bleken. Verdere passages met deze subpopulaties resulteerden telkens in een heterogene tumor die zowel CD44⁺CD24^{-/low}Lin⁻ tumorogene cellen bevat als andere niet-tumorogene fenotypes zonder sporen van een verminderde tumorogeniciteit (Tabel 2). Dit leverde het bewijs dat cellen met het fenotype CD44⁺CD24^{-/low}Lin⁻ de twee belangrijke stamceleigenschappen bezit, namelijk zelfvernieuwing en differentiatie. Verdere verrijking van tumorogene activiteit kon men bekomen door de ESA+ cellen te isoleren uit de CD44⁺CD24^{-/low}Lin⁻ subpopulatie.

Met deze gegevens gingen Ponti en collega's²³ aan de slag om voor het eerst BCSC *in vitro* te isoleren en te laten delen. Dit deden ze door het sfeervormingsprotocol toe te passen. De gevormde MMS werden vervolgens geëvalueerd op de expressie van CD44 en CD24. De meerderheid (95-98%) van cellen waren positief voor CD44 en negatief voor CD24. Deze cellen bleken tevens meer tumorogeen te zijn dan de oorspronkelijk gebruikte cellijnen.

Tabel 2: Capaciteit van verschillende subpopulaties van cellen gesorteerd op basis van flow cytometrie om nieuwe tumoren te vormen wanneer ze worden geïnjecteerd in SCID muizen (*uit Al-Hajj, 2003*)³³.

	Tumors/injections		
	8 × 10 ⁵	5 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵
Passaged T1			
CD44 ⁻	0/2	0/2	—
CD44 ⁺	2/2	2/2	—
B38.1 ⁻	0/2	0/2	—
B38.1 ⁺	2/2	2/2	—
CD24 ⁺	—	—	1/6
CD24 ⁻	—	—	6/6
Passaged T2			
CD44 ⁻	0/2	0/2	—
CD44 ⁺	2/2	2/2	—
B38.1 ⁻	0/2	0/2	—
B38.1 ⁺	2/2	2/2	—
CD24 ⁺	—	—	1/6
CD24 ⁻	—	—	6/6

CD49f of alpha-6 integrine wordt gebruikt om mammaire epitheelcellen te identificeren. Recent werd aangetoond dat CD49f nodig is voor de groei van MMS en voor het behouden van de *in vivo* tumorigeniciteit³⁴. Uit het sfeervormingsprotocol bleek er een overexpressie te zijn van CD49f in de MMS. Om de functionele rol van CD49f te achterhalen gebruikte men 2 verschillende benaderingen: 1) de cellen incuberen met een CD49f blokkerend antilichaam; 2) de knockdown van het *ITGA6* gen, dat codeert voor het alfa-6 integrine. Beide methodes zorgden voor een volledig verlies van MMS-vormende capaciteit en bovendien waren de *ITGA6*-negatieve cellen *in vivo* niet meer tumorogeen.

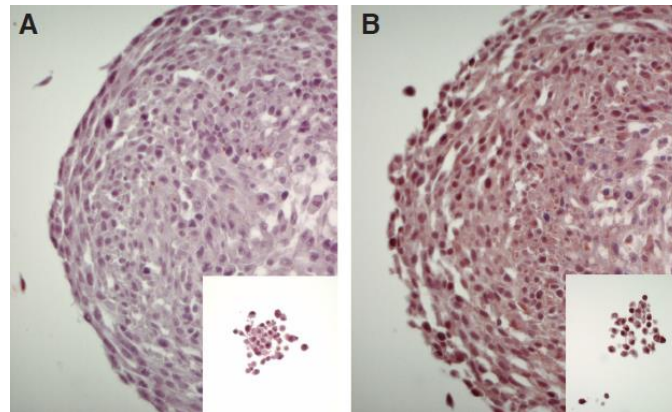
Ook de expressie van andere merkers zoals ALDH1, chemokine receptor type 4 (CXCR4), ABCG2 (alleen positief³⁵⁻³⁷), CD133 (negatief), cytokeratine (CK) en verschillende pluripotentiemerkers werden onderzocht in humane borstkanker. CXCR4 wordt tot expressie gebracht op hematopoëtische stamcellen en bindt aan het chemokineligand 12 (CXCL12). Deze receptor wordt verhoogd tot expressie gebracht zowel in MMS als in metastatische borstkankercellen. Organen die het doelwit vormen voor borstkankermetastasen vertonen overeenkomstig de hoogste expressie van het ligand CXCL12³⁶. CD133, een cholesterol-bindend glycoproteïne, is een CSC merker voor hersen-, colon- en prostaatkanker maar de relevantie van deze merker in humane BCSC is, in tegenstelling tot muriene³⁹ BCSC, nog niet bewezen^{37,38}. De pluripotentiemerkers Oct-4 en Sox2 zijn beide embryonale transcriptiefactoren die de zelfvernieuwing en differentiatie van embryonale stamcellen (ESC) regelen. Sox2 blijkt vooral tot expressie te worden gebracht in het initiële stadium van borstkanker. Onderdrukken van Sox2 expressie verhindert de vorming van sferen en gene silencing zorgde voor een reductie in de grootte van gevormde tumoren in SCID muizen⁴⁰. De expressie van Oct-4 werd reeds in verschillende studies aangetoond^{12,41}, doch wordt deze bevinding in een andere studie dan weer toegeschreven aan het bestaan van pseudogenen van Oct-4⁴⁰. Cytokeratinemerkers worden gebruikt om differentiatie aan te tonen in melkkliercellen. Basale epitheliale cellen brengen CK5/6/14 en CD10 (CALLA) tot expressie terwijl lumenale epitheliale cellen CK 7/8/18/19 tot expressie brengen⁴²⁻⁴⁴. Het expressiepatroon van cytokeratines en de relatie tot de kankercel van origine is nog onduidelijk⁴³. In verschillende studies wordt CK19 verondersteld een stamcelmerker te zijn⁴⁴⁻⁴⁶.

3.1.3. Caniene borstkankerstemcellen

Ook in caniene borstkankers bestaat er een tumorinitiërende subpopulatie die in staat is *in vitro* MMS te vormen en *in vivo* tumoren in SCID muizen⁴⁷. Deze subpopulatie brengt ABC-transportproteïnen tot expressie en bevat dus ook SP cellen³¹. Door het uitvoeren van SP analyses en deze populatie te selecteren op Stamcel antigeen-1 (Sca-1) (een bewezen merker van progenitorcellen in de melkklier van de muis) kon men een enorme verrijking krijgen van SP cellen⁴⁹. Deze SP cellen werden getest op de aanwezigheid van bepaalde humane stamcel- en kankerstemcelmerkers zoals CD10 (zinkafhankelijk metalloprotease karakteristiek voor myoepitheliale cellen), CD34 (een vasculaire endotheliale merker⁷⁶), CD44, CD24, CD49f en bleken CD10^{low}/CD34+/CD44+/CD24^{low}/CD49f+ te zijn.

Een andere manier om caniene BCSC te isoleren is door te selecteren op CD133. De MMS gevormd door deze populatie brachten eveneens de embryonale stamcelmerkers Oct-4 en Sox2 tot expressie (Figuur 5). Oct-4 kwam daarbij enkel tot expressie op de perifere cellen van de sferoïden, wat een

aanwijzing is voor asymmetrische deling. Centrale cellen zijn meer gedifferentieerde cellen en ontbreken dus aan stamcelmerkers. Sox2 expressie bleek tegengesteld te zijn aan de Caspase 3. Caspase 3 expressie komt vooral centraal voor in de MMS en wijst op apoptotische cellen⁴⁹.



Figuur 5: cellen gesorteerd voor CD133+ kleuren positief voor Oct-4 (A) en Sox2 (B). Merk op dat enkel de perifere cellen gekleurd kunnen worden met Oct-4 antilichaam terwijl de meeste cellen, met uitzondering van de centrale cellen, kleuren voor Sox2 (uit Ferletta, 2011)⁴⁹.

Tabel 3: Een vergelijking van humane en caniene BCSC merkers.

CSC merker	<i>mens</i>	<i>hond</i>
CD44	+	+
CD24	±	±
CD49f	+	+
ESA	+	?
Lin	-	?
CD34	?	+
CD10	-	±
CD133	?	+
Sox2	+	+
Oct-4	+	+
CXCR4	+	?
ALDH1	+	?
ABCG2	+	+
Myoepitheliale CK	-	?
Luminale CK	+	?

+: aanwezig; ±: laag aanwezig; -: niet aanwezig; ?: nog niet aangetoond.

3.2. Borstkankerstamcel gerelateerde pathways, genen, moleculen en hun rol in borstkanker: hond versus mens.

Tot op heden zijn er verschillende pathways en genen beschreven die een rol spelen in de zelfvernieuwing- en differentiatiecapaciteiten van stamcellen. Bij ontregeling van deze pathways of genen, zouden vervolgens melkkliertumoren kunnen ontstaan. In tabel 4 wordt een vergelijkende analyse gemaakt van de rol van deze genen en signalling pathways in zowel humane als caniene melkkliertumoren. Deze tabel is niet limiterend en richt zich uitsluitend tot mechanismen betrokken in stamcellen.

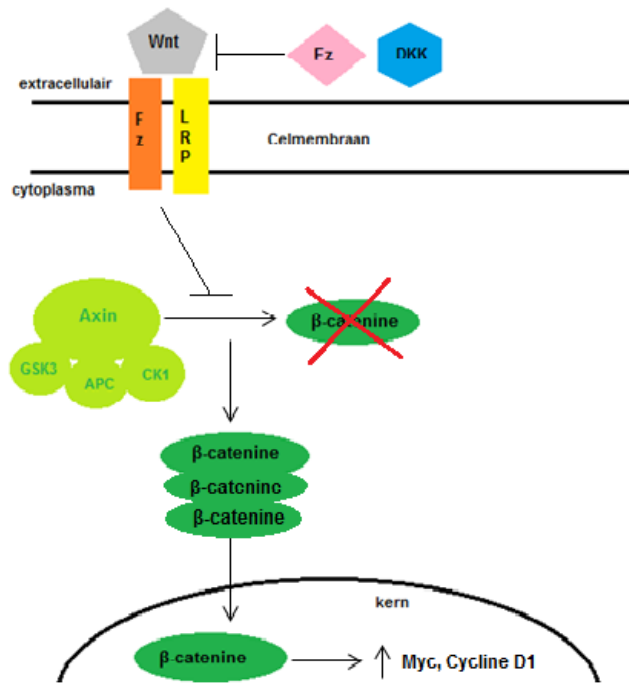
Tabel 4: Vergelijkende analyse van de rol van genen en signalling pathways betrokken in de carcinogenese van humaan en canien melkklierweefsel (naar Malhotra,2011; Pinho, 2012)^{51,52}.

Gen/pathway	Humane borstkanker	Caniene melkkliertumoren
Wnt- β -catenine	↑	↑
PI3K/AKT	↑	↑
PTEN	↓	↓
SHH	↑	?
Notch	↑	?
BRCA1	↓	↓
p53	↓	↓

Legende: ↑ = verhoogde expressie; ↓ = verminderde expressie; ? = niet bekend

a. Wingless- β -catenine pathway

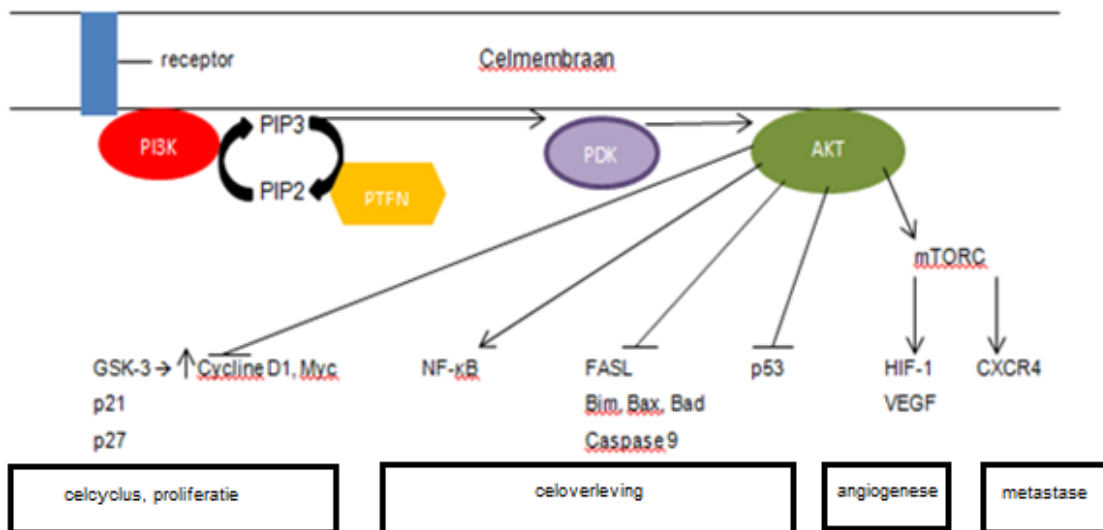
De wingless (Wnt)- β -catenine pathway is betrokken bij zowel pre- als postnatale ontwikkeling van de normale melkklier, de involutie ervan na lactatie en het onderhouden van de stamcelpool⁵⁵. Activatie van de pathway gebeurt door de binding van een Wnt-ligand op de oppervlaktereceptoren Frizzled (Fz) en zijn coreceptor lipoproteïne-receptor-gerelateerde proteïnen (LRP). Interactie tussen ligand en receptor kan gemoduleerd worden door bepaalde antagonisten zoals proteïnen van de Fz en Dickkopf (DKK) familie (Figuur 6). De interactie van het ligand met de receptor verhindert de afbraak van β -catenine door het Axin complex, bestaande uit glycogeen synthase 3 (GSK3), caseïne kinase 1 α (CK1 α), Axin en adenomateuze polyposis coli (APC). β -catenine migreert naar de celkern waar het zorgt voor de transcriptie van bepaalde doelgenen waaronder proto-oncogenen zoals *c-Myc* (codeert voor Myc) en *CCND1* (codeert voor Cycline D1) die een belangrijke rol spelen in de regulatie van de celcyclus (Figuur 6). In humane borstkanker wordt regelmatig silencing en promotormethylatie van de antagonisten aangetoond wat leidt tot de activatie van de Wnt- β -catenine pathway^{53,54}. Ook in caniene melkkliertumoren werd er een verminderde expressie Wnt-antagonisten aangetoond^{55,56}.



Figuur 6: schematische voorstelling Wingless(Wnt)-β-catenine pathway. → : activatie; —| : inactivatie. Wnt= Wingless; Fz= Frizzled; DKK= Dickkopf; LRP= lipoproteïne-receptor-gerelateerde proteïnen; GSK3= glycogeen synthase kinase 3; CK1= caseïne kinase 1; APC= adenomatous polyposis coli (naar Turashvili et al., 2006)⁵⁵.

a. Fosfoinositide 3-kinase/Murine thymoma viral oncogene homolog 1 pathway

Verhoogde activiteit van de fosfoinositide 3-kinase (PI3K)/ Murine thymoma viral oncogene homolog 1 (Akt) pathway is veel voorkomend in zowel humane^{57,58,59} borstkanker als in caniene melkkliertumoren⁵⁶. De initiatie van deze pathway ontstaat door de binding van een ligand op een tyrosine-kinase receptor. Deze binding zorgt voor een activatie van de catalytische subunit (p110α) van PI3K en zo voor de omzetting van fosfatidylinositol-bifosfaat (PIP₂) in fosfatidylinositol-trifosfaat (PIP₃). PIP₃ doet dienst als second messenger en zorgt via fosfoinositide-afhankelijk proteïne kinase (PDK) voor een activatie van Akt, wat op zijn beurt zorgt voor een wijziging van bepaalde aspecten van celbiologie die bijdragen tot de hoofdeigenschappen van kanker zoals celgroei, celoverleving, proliferatie, angiogenese en metastase (Figuur 7). Fosfatase en tensine homolog (PTEN), een lipidefosfatase, zorgt voor een tegengestelde werking door de defosforylatie van PIP₃ tot PIP₂^{58,59} (Figuur 7).



Figuur 7: Schematische voorstelling van de PI3K/Akt pathway en targets op cellulair niveau gegroepeerd volgens kankereigenschap waar ze toe bijdragen. → : activatie; —|: inactivatie. GSK-3= glycogeen synthase kinase 3; FASL= Fas Ligand; HIF-1= hypoxia-inducible factor; VEGF= vascular endothelial growth factor; CXCR4= chemokinereceptor type 4; PDK= fosfoinositide-afhankelijk proteïne kinase (naar Dillon, 2007; Castaneda, 2010)^{58,59}.

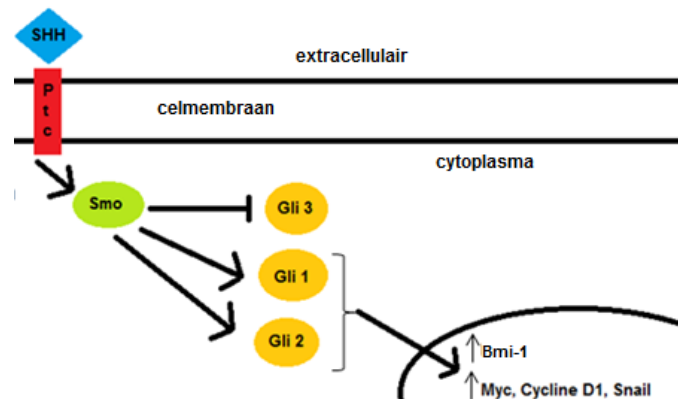
De rol van deze pathway in het onderhouden van de kankerstemcelpool werd bewezen door knockdown van PTEN, wat *in vitro* resulteerde in een verrijking van BCSC zowel in het sfeervormingsprotocol als in de ALDH1 analyse en, *in vivo* gepaard ging met een verhoogde tumorigeniciteit. Deze MMS vertoonden een verhoogde activatie van de Akt pathway, wat bovendien samen ging met verhoogde fosforylatie (inhibitie) van GSK-3 en β -catenine activatie. Dit suggereert dus dat het effect van de Akt pathway op CSC gemedieerd wordt door activatie van de Wnt-signalling pathway via fosforylatie van GSK-3. Deze veronderstelling werd bewezen door gebruik te maken van een TOP-GFP reporter systeem dat geactiveerd wordt door β -catenine. Inhibitie van de Akt pathway door perifosine zorgde voor een reductie van cellen die TOP-GFP tot expressie brengen. Dit effect kon teniet worden gedaan door de GSK3 inhibitor Bio⁶⁰.

In humane borstkanker blijken 3 mechanismen belangrijk te zijn in de activatie van deze pathway⁵⁷⁻⁵⁹: 1) puntmutatie in het *PIK3CA* gen dat codeert voor de catalytische subunit van PI3K; 2) mutaties in Akt1 en 3) verlies van PTEN activiteit door mutaties, deleties en promotor methylatie. In caniene melkkliertumoren is voorlopig enkel dit laatste mechanisme beschreven als een onderliggende basis voor een verhoogde activiteit van de PI3K/Akt pathway^{56,61,62}.

b. Sonic Hedgehog/ Bmi-1

Deze pathway speelt een belangrijke rol in de organogenese en later in weefselhomeostase, regeneratie en het onderhouden van de adulte stemcelpool⁵⁶. Activatie gebeurt door binding van het SHH ligand op de transmembraanproteïne receptor PATCH1 (Ptc) waardoor Smoothened (Smo) geactiveerd wordt, met een verhoogde expressie van de transcriptiefactoren (TF) Gli1 en Gli2, en een

repressie van TF Gli3 tot gevolg^{56,63}. Dit alles resulteert in 1) een verhoogde expressie van Bmi-1, een negatieve regulator van bepaalde celcyclusregulatoren binnen het INK-4A/ADP ribosylatie factor (ARF) complex zoals p16INK4a en p19ARF, en 2) een verhoogde expressie van positieve celcyclusregulatoren zoals Myc, Cycline D1 en Snail (Figuur 8). PTCH1, Gli1, Gli2 en Bmi-1 worden sterk tot expressie gebracht in zowel humane melkklier stam- en progenitorcellen als in MMS, en deze expressie vermindert naarmate cellen verder differentiëren. Activatie van de pathway leidt zowel tot een toename van het aantal gevormde MMS als de grootte ervan, terwijl een inhibitie door cyclopamine het tegengestelde effect teweegbrengt. Mutaties in Ptc en Smo zouden aan de basis liggen van een deregulatie van de pathway en het ontstaan van borstkanker. De tumorinitiërende CD44⁺/CD24^{low}/lin⁻ subpopulatie vertoont een sterk verhoogde expressie van de Hedgehog componenten in vergelijking met andere kankercellen⁶³. Over de rol van deze pathway in caniene melkkliertumoren is nog niets bekend.

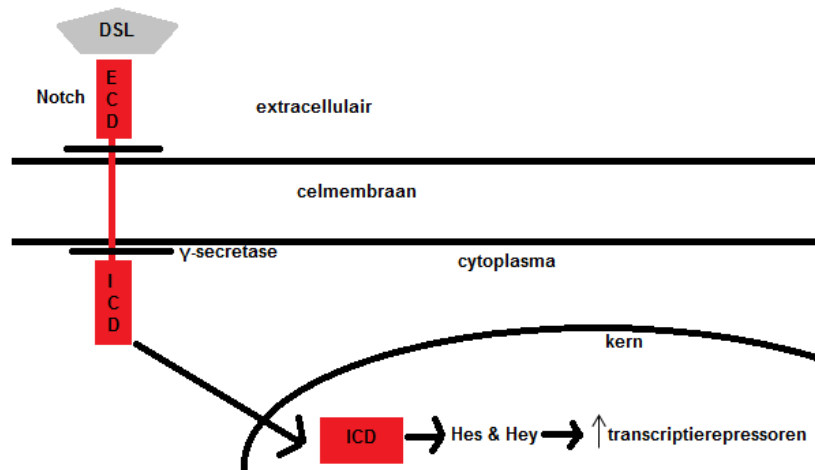


Figuur 8: Schematische voorstelling van de Sonic Hedgehog (SHH)/ Bmi-1 pathway. →: activatie; —|: inactivatie. SHH= Sonic Hedgehog; Ptc= Patched; Smo= Smoothened (naar Malhotra et al., 2011)⁵¹.

c. Notch signalling

Notch signalling reguleert differentiatie van de normale melkklier. Activatie van deze pathway verhindert terminale differentiatie van de melkklierepithelcellen waardoor deze blijven prolifereren^{64,65}. De pathway start door interactie van een Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) ligand, waar er vijf van bestaan (Delta-like-1,-3, en -4, en Jagged 1 en 2), met één van de vier Notch receptoren. Er bestaat een celtype specifieke distributie van de verschillende Notch receptoren: Notch-1 en -3 worden tot expressie gebracht op luminale cellen terwijl Notch-4 tot expressie wordt gebracht op basale cellen van de melkklier. De ligand-receptor interactie resulteert in een ontkoppeling van het extra- en intracellulair domein van de Notch receptor gevolgd door een klieving door γ -secretase, waardoor het intracellulair domein zich naar de nucleus kan verplaatsen waar het zorgt voor een activatie van CSL. Deze activatie resulteert in de transcriptie van Hes en Hey genen die coderen voor transcriptierepressoren^{51,64,65} (Figuur 9).

Er werd aangetoond dat een activatie van de pathway door een DSL peptide de vorming van MMS promoot terwijl een γ -secretase-inhibitor MMS vorming inhibeert. Dit wijst op een rol van Notch signalling in zelfvernieuwing van stamcellen⁶⁵. Alle Notch receptoren bleken verhoogd tot expressie te worden gebracht in melkkliertumoren, maar enkel Notch-4 vertoont een hogere expressie in CSC in vergelijking met andere tumorcellen⁶⁶. Over de rol van deze pathway in caniene melkkliertumoren is ook hier weerom niets bekend.



Figuur 9: Schematische voorstelling van de Notch signalling pathway. \rightarrow : activatie; — : knipplaats; ECD = extracellulair domein; ICD = intracellulair domein (naar Malhotra et al., 2011)⁵¹.

e. Breast Cancer susceptibility gene 1

Individen met heterozygote kiemlijnmutaties in het *BRCA1* gen hebben een hoger risico voor het ontwikkelen van borstkanker ten gevolge van mutaties en dus verlies van heterozygotie voor dit tumorsuppressorgen⁶⁷. *BRCA1* speelt onder andere een rol in het herstel van dubbelstrengige DNA breuken door homologe recombinatie^{68,69}. Bovendien zou *BRCA1* expressie nodig zijn voor de differentiatie van ER- stamcellen in ER+ lumenale⁶⁸ cellen en *BRCA1* dus dienst doen als stamcelregulator⁷⁰. Knockdown van dit gen resulteert in een verhoogde expressie van de stamcelmarker ALDH1 en een verminderde expressie van lumenale epitheliale markers en ER. Dit veronderstelt dus dat verlies van *BRCA1* expressie leidt tot een accumulatie van genetisch onstabiele stamcellen die een gemakkelijk doelwit zijn voor carcinogenese⁶⁸. Ook in caniene melkkliertumoren werd er een verminderde expressie aangetoond van *BRCA1*, wat geassocieerd werd met ER-tumoren⁷⁰.

f. protein 53

Verlies van *TP53* expressie (het gen dat codeert voor protein 53 ofwel p53) ten gevolge van mutaties is zowel bij de hond⁷¹ als bij de mens⁷² geassocieerd met het ontstaan van melkkliertumoren. p53 is een tumorsuppressoreiwit dat betrokken bij de regulatie van de celcyclus, celgroei, apoptose, DNA herstel, autofagie en andere functies die essentieel zijn ter preventie van maligne transformatie⁷³. Bovendien werd voor humane borstkanker aangetoond dat p53 de expressie van de BCSC marker CD44 inhibeert door te binden ter hoogte van de promotorregio van CD44 waardoor de cel kan

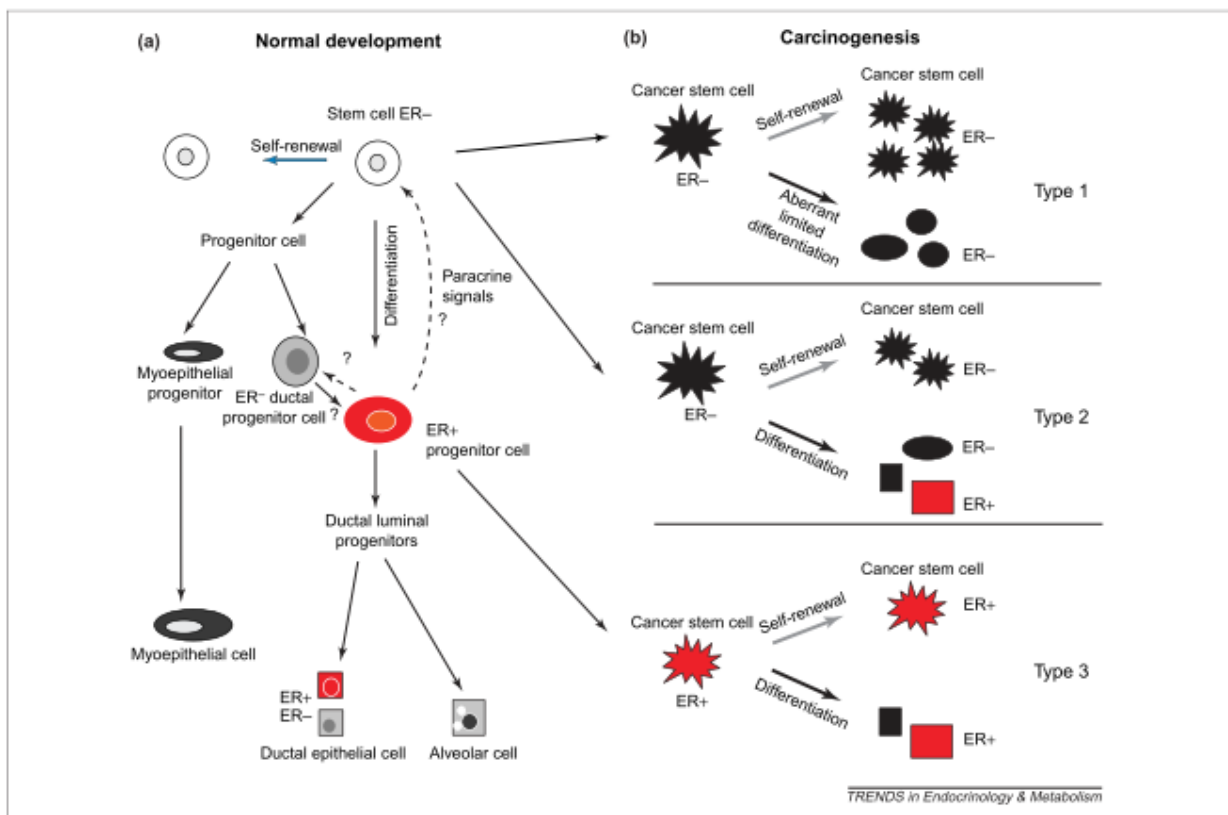
reageren op apoptotische signalen die normaal geblokkeerd zouden worden door de acties van CD44. Bij gevolg zal in de afwezigheid van p53 er een derepressie plaatsvinden van CD44 resulterend in de expansie BCSC⁷⁴.

3.3. De heterogene borstkankerstemcelpopulatie

Het bestaan van een heterogene stemcelpopulatie die aanleiding geeft tot het ontstaan van verschillende soorten kanker is reeds bewezen voor leukemie, maar ook voor borstkanker zijn er verschillende aanwijzingen die ook in deze richting wijzen.

3.3.1 Borstkankerstemcellen en de oestrogenreceptor

Het is geweten dat tumoren die oestrogen receptoren tot expressie brengen (ER+) een betere prognose hebben dan ER- tumoren. ER- tumoren zijn vaak agressiever en reageren niet op anti-oestrogenen zoals tamoxifen en aromatase-inhibitoren. De onderliggende factoren die het fenotype sturen naar ER- of ER+ zijn tot op heden niet geweten. Lang werd verondersteld dat ER+ cellen volledig gedifferentieerde en rustende cellen zijn, omdat deze cellen geen proliferatiemerkers tot expressie brengen⁷⁵. Dontu en collega's⁷⁶ weerlegden dit en brachten een model naar voor waarin ER- en ER+ tumoren ontstaan door transformatie van verschillende populaties stem- en progenitorcellen (Figuur 10, Tabel 5). Deze cellen geven op hun beurt ontstaan aan snel prolifererende cellen die uiteindelijk hun ER receptor verliezen.



Figuur 10: Ontwikkeling van de melkklier (a), carcinogenese (b) en de oestrogenreceptor (uit Dontu, 2004)⁷⁶.

Type 1 tumoren (ER-) worden in dit model⁷⁶ verondersteld te ontstaan uit de meest primitieve stamcel. Deze tumoren brengen zowel lumbinale (CK8, CK18, CK19) als basale (CK5/6,14) merkers tot expressie en zijn op histologie weinig gedifferentieerd. Het risico op dit type tumor stijgt niet door hormonale vervangingstherapie (HRT) en daalt niet door toediening van 'selective oestrogeen receptor modifiers' (SERMs). Het 2^{de} type ontstaat eveneens uit deze ER- stamcel maar de mutaties die in deze stamcel plaatsvonden laten de cel nog toe te differentiëren in ER+ cellen. Deze tumoren bevatten dus zowel ER+ als ER- kankercellen. Door het gebruik van anti-oestrogenen zal de tumor wel krimpen maar de proliferatie van ER- stamcel zal blijven doorgaan met nog meer mogelijke mutaties tot gevolg. Deze bijkomende mutaties zouden de differentiatie van de ER- cellen kunnen blokkeren, wat zal resulteren in het verlies van de oestrogeenreceptor. Een 3^{de} type van borstkanker zou ontstaan door transformatie van ER+ progenitorcellen en brengen enkel lumbinale merkers tot expressie (Figuur 10). Ze zijn histologisch meer gedifferentieerd en reageren goed op anti-oestrogeen therapie.

Tabel 5: Subtypes van borstkanker gebaseerd op de cel van oorsprong (uit Dontu, 2004)⁷⁶.

Cancer type	Type 1	Type 2	Type 3
Cell of origin	Stem cell	Stem cell	ER + progenitor
ESR expression	Negative	Heterogeneous ^b	Positive
Histology	Undifferentiated	Intermediate differentiation	Differentiated
	Basal and luminal markers present		Luminal markers only
Prognosis	Poor	Intermediate	Good
Risk from HRT	Unchanged	Limited	Increased
Efficacy of SERMs in prevention	None	Limited	High

Afkortingen: ESR= oestrogeen receptor; HRT= hormone replacement therapy; SERMs= selective estrogen receptor modifiers.

3.3.2. Borstkankertypes en de relatie tot merkerexpressie

Humane borstkanker wordt op basis van het genexpressieprofiel ingedeeld in een lumbinaal type A/B, een basaal type en een Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 positief (HER2+) type. Het HER2+ type is ER-, het lumbinaal type is ER+ waarbij A een hogere ER expressie vertoont dan B. Lumbinaal B kan daarenboven HER2+/- zijn, terwijl A altijd HER- is. Het basaaltype is triple negatief, wat wil zeggen ER-, PR-, HER2-⁷⁷. Hoewel volgens vele studies het fenotype CD44+/CD24- karakteristiek is voor BCSC, toch werd aangetoond dat er een grote heterogeniteit is binnen de expressie van deze merkers in de verschillende subtypes van borstkanker⁷⁸. In HER2+ type tumoren kwam het CD44+/CD24- fenotype weinig/niet voor, deze tumoren bleken vooral CD24+ te zijn, terwijl het CD44+/CD24- fenotype opvallend veel voorkomt bij het basaaltype tumor. Dit type tumor is triple-, CK5/6/14+ en is het type dat vaak voorkomt in associatie met BRCA1 erfelijke borstkanker⁷⁸. Ook andere merkers zoals ALDH1, ABCG2, CXCR4 blijken heterogeen tot expressie te worden gebracht tussen verschillende borstkankertypes (Tabel 6).

Tabel 6: Verschillende humane borstkankercellijnen brengen verschillende kankerstemcelmerkers tot expressie (uit Hwang-Verslues, 2009)⁸⁰.

Marker/ Cell line	MB468	MB231	HCC1937	T47D	MCF7	ZR75	SKBR3	MB361
ER	-	-	-	+	+	+	-	+
PR	-	-	-	+	+	-	-	-
HER2							o.e.	o.e.
CD44	+++	+++	+++	++	++	+	+	+++
CD24	+++	-	++	+++	+++	+++	+++	-
CD44 ⁺ / CD24 ^{-low}	-	+++	++	-	-	-	-	+++
CD133	+++	-	-	-	-	-	-	-
PROCR	-	++	-	-/+	-	-	-	++
ABCG2	-	-	-	-	+	-	-	-
CXCR4	-	-	-	-	-	+	-	-
ESA	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ALDH	+	+	+	-	+	+	++	-

The ER/PR (+/-) and HER2 overexpression (o.e.) status were adapted from Neve et al (2006)[44].
 -, not detectable.
 +, <5%.
 ++, 5-70% of the cells express the marker indicated.
 +++, >70% of the cells express the marker indicated.

BESPREKING

Melkkliertumoren komen voor bij alle zoogdieren, maar niet alle zoogdieren zijn even gevoelig voor het ontwikkelen ervan. Het vergelijken van de ziekte tussen verschillende species kan een grote bijdrage leveren aan het begrijpen van de onderliggende moleculaire mechanismen, de risicofactoren en de genetische expressieprofielen van dit type kanker⁸¹. Zowel uit humane als caniene melkkliertumoren werd er reeds een populatie cellen geïsoleerd met stamcelkarakteristieken^{36,47}. Deze tumorinitiërende populatie bevat duidelijk gelijkenissen tussen beide species wat betreft fenotypische en functionele eigenschappen. Ze brengen bijvoorbeeld beide ABC transporteiwitten^{35,48} tot expressie, evenals de oppervlaktemerkers CD44, CD49f, SOX2 en Oct-4^{34-37,48}. Niettemin zijn er nog heel wat onwetendheden en tegenstrijdigheden met betrekking tot deze karakterisatie. Zo is het voor CD133, een bewezen CSC merker voor meerdere soorten kankers, inclusief voor melkkliertumoren bij de muis en hond, nog steeds niet duidelijk wat de rol ervan is voor humane borstkanker^{37,38}. Wat betreffende caniene melkkliertumoren zijn er verschillende merkers nog niet grondig bestudeerd en door dit beperkt onderzoek dat nog maar verricht werd zijn de beschikbare gegevens minder betrouwbaar dan de gegevens voor humane borstkanker. Het onderzoek dat tot op heden werd verricht omtrent pathways en genen gerelateerd aan de CSC vertoont opvallend veel gelijkenissen tussen beide species. Knockdown van *TP53*^{71,72,74} of *BRCA1*^{68,70} evenals verhoogde expressie van de Wnt- β -catenine pathway⁵³⁻⁵⁶ en de PI3K/Akt pathway^{56-58,61,62} wordt, zowel bij de hond als bij de mens, geassocieerd met de ontwikkeling van melkkliertumoren. De belangrijke rol van SHH⁶³ en Notch signalling pathway^{65,66} in humane BCSC werd reeds bewezen maar moet nog onderzocht worden voor caniene BCSC.

Losstaand van deze interspecies vergelijking, is één van de cruciale onbeantwoorde vragen echter, of het een stam- of progenitorcel is die de carcinogenese op gang brengt. Genexpressie en pathways zouden namelijk kunnen verschillen tussen stam- en progenitorcellen waardoor dus ook het therapeutisch doelwit verandert. Gaat het om een progenitorcel die de mogelijkheid verwerft zelfvernieuwing te ondergaan, dan zou deze mutatie het doelwit kunnen zijn voor therapie¹⁴. Een andere theorie die niet mag uitgesloten worden is het bestaan van een heterogene BCSC populatie^{76,78}. Er werd immers al in verschillende studies aangetoond dat de merkerexpressie van humane BCSC kan verschillen naargelang het subtype borstkanker. Deze bevindingen roepen belangrijke vragen op⁷⁹. Is het CD44+/CD24- fenotype enkel geassocieerd met tumorinitiërende cellen in bepaalde subtypes van borstkanker? Worden kankers die dit fenotype niet tot expressie brengen door een andere CSC gedreven? Als dit het geval is, hebben deze CSC met een ander fenotype dan ook een andere origine? Het bestaan van verschillende CSC in elk type borstkanker zouden het verschil in metastase, invasie, prognose en de respons op therapie kunnen verklaren⁸⁰.

Men kan dus besluiten dat er duidelijk aanwijzingen zijn voor een sterke gelijkenis tussen humane en caniene melkklier tumoren betreffende CSC merkers, kanker-gerelateerde genen en pathways. Deze gegevens bieden een sterke basis om de hond als waardevol model te beschouwen voor humane borstkanker. Aangezien deze pathways belangrijke doelwitten zijn voor toekomstige therapieën zal dit,

na bevestiging door bijkomend experimenteel onderzoek, de mogelijkheid geven om de hond te integreren als preklinisch model om op die manier de humane klinische studies te optimaliseren, laattijdige uitval van therapeutica tot een minimum te beperken en alzo bij te dragen tot een efficiëntere ontwikkeling van nieuwe kankertherapeutica^{1,3}.

REFERENTIES

1. Paoloni, M. and C. Khanna (2008). "Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans." Nat Rev Cancer **8**(2): 147-156.
2. Cespedes, M. V., et al. (2006). "Mouse models in oncogenesis and cancer therapy." Clin Transl Oncol **8**(5): 318-329.
3. Pang, L. Y. and D. J. Argyle (2009). "Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology." Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease **1792**(4): 380-391.
4. Richmond, A. and Y. Su (2008). "Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics." Dis Model Mech **1**(2-3): 78-82.
5. Thomas, H. and F. R. Balkwill (1994). "Oncogene Transgenic Mice as Therapeutic Models in Cancer-Research." European Journal of Cancer **30A**(4): 533-537.
6. Tonkens, R. (2005). "An overview of the drug development process." Physician Exec **31**(3): 48-52.
7. Schneider, R. (1970). "Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer." Cancer **26**(2): 419-426.
8. Porrello, A., et al. (2004). "Pet models in cancer research: general principles." J Exp Clin Cancer Res **23**(2): 181-193.
9. Hansen, K. and C. Khanna (2004). "Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development." European Journal of Cancer **40**(6): 858-880.
10. Porrello, A., et al. (2006). "Oncology of companion animals as a model for humans. An overview of tumor histotypes." Journal of Experimental & Clinical Cancer Research **25**(1): 97-105.
11. Owen, L. N. (1979). "A comparative study of canine and human breast cancer." Invest Cell Pathol **2**(4): 257-275.
12. Antuofermo, E., et al. (2007). "Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs--a model of breast cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(11): 2247-2256.
13. Rivera, P., et al. (2009). "Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2." Cancer Res **69**(22): 8770-8774.
14. Lobo, N. A., et al. (2007). "The biology of cancer stem cells." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 675-699.
15. Ponti, D., et al. (2006). "Breast cancer stem cells: an overview." Eur J Cancer **42**(9): 1219-1224.
16. Pardal, R., et al. (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." Nat Rev Cancer **3**(12): 895-902.
17. Pinho, S. S., et al. (2012). "Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis." Transl Res **159**(3): 165-172.
18. Tataria, M., et al. (2006). "Stem cells: tissue regeneration and cancer." Semin Pediatr Surg **15**(4): 284-292.
19. Mayol, J. F., et al. (2009). "Characterisation of normal and cancer stem cells: one experimental paradigm for two kinds of stem cells." Bioessays **31**(9): 993-1001.
20. Dick, J. E. (2008). "Stem cell concepts renew cancer research." Blood **112**(13): 4793-4807.
21. Clarke, M. F. and M. Fuller (2006). "Stem cells and cancer: two faces of eve." Cell **124**(6): 1111-1115.
22. Fox, S. B., et al. (1995). "The prognostic value of quantitative angiogenesis in breast cancer and role of adhesion molecule expression in tumor endothelium." Breast Cancer Res Treat **36**(2): 219-226.
23. Ponti, D., et al. (2005). "Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties." Cancer Res **65**(13): 5506-5511.
24. Jordan, C. T., et al. (2006). "Cancer stem cells." N Engl J Med **355**(12): 1253-1261.
25. Dontu, G. and M. S. Wicha (2005). "Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia." J Mammary Gland Biol Neoplasia **10**(1): 75-86.
26. Shaw, F. L., et al. (2012). "A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity." J Mammary Gland Biol Neoplasia **17**(2): 111-117.
27. Wilson, H., et al. (2008). "Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma." Vet J **175**(1): 69-75
28. Fabian, A., et al. (2009). "Die hard: are cancer stem cells the Bruce Willises of tumor biology?" Cytometry A **75**(1): 67-74
29. Basu-Roy, U., et al. (2012). "Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma." Cancer Lett.
30. Greve, B., et al. (2012). "Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation." Cytometry A **81**(4): 284-293.
31. Pierre-Louis, O., et al. (2009). "Dual SP/ALDH functionalities refine the human hematopoietic Lin-CD34+CD38- stem/progenitor cell compartment." Stem Cells **27**(10): 2552-2562

32. Lapidot, T., et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-648.
33. Al-Hajj, M., et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-3988.
34. Cariati, M., et al. (2008). "Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line." International Journal of Cancer **122**(2): 298-304.
35. Ginestier, C., et al. (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." Cell Stem Cell **1**(5): 555-567.
36. Muller, A., et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-56
37. Charafe-Jauffret, E., et al. (2009). "Breast cancer stem cells: tools and models to rely on." BMC Cancer **9**: 202.
38. Mizrak, D., et al. (2008). "CD133: molecule of the moment." J Pathol **214**(1): 3-9.
39. Wright, M. H., et al. (2008). "Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics." Breast Cancer Res **10**(1): R10.
40. Leis, O., et al. (2012). "Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells." Oncogene **31**(11): 1354-1365.
41. Liu, C. G., et al. (2011). "Clinical implications of stem cell gene Oct-4 expression in breast cancer." Ann Surg **253**(6): 1165-1171.
42. Morrison, B. J., et al. (2008). "Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer." Breast Cancer Res **10**(4): 210.
43. Gusterson, B. A., et al. (2005). "Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer." Breast Cancer Research **7**(4): 143-148
44. Clarke, R. B., et al. (2005). "A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells." Dev Biol **277**(2): 443-456.
45. Petersen, O. W. and K. Polyak (2010). "Stem cells in the human breast." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(5): a003160.
46. Bartek, J., et al. (1985). "Patterns of Expression of Keratin-19 as Detected with Monoclonal-Antibodies in Human-Breast Tissues and Tumors." International Journal of Cancer **36**(3): 299-306.
47. Cocola, C., et al. (2009). "Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumour-initiating potential." Reprod Domest Anim **44 Suppl 2**: 214-217.
48. Honscha, K. U., et al. (2009). "Expression of ABC-transport proteins in canine mammary cancer: consequences for chemotherapy." Reprod Domest Anim **44 Suppl 2**: 218-223.
49. Ferletta, M., et al. (2011). "Canine mammary tumors contain cancer stem-like cells and form spheroids with an embryonic stem cell signature." Int J Dev Biol **55**(7-9): 791-799.
50. Da Silva, B. B., et al. (2009). "Angiogenesis in breast cancer: comparison between three vascular endothelial markers." Cancer Res **69**(2): 116s-117s.
51. Malhotra, G. K., et al. (2011). "Shared signaling pathways in normal and breast cancer stem cells." J Carcinog **10**: 38.
52. Pinho, S. S., et al. (2012). "Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis." Transl Res **159**(3): 165-172.
53. Suzuki, H., et al. (2008). "Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer." Br J Cancer **98**(6): 1147-1156.
54. Turashvili, G., et al. (2006). "Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis." Pathobiology **73**(5): 213-223.
55. Rao, N. A., et al. (2008). "cDNA microarray profiles of canine mammary tumour cell lines reveal deregulated pathways pertaining to their phenotype." Anim Genet **39**(4): 333-345.
56. Uva, P., et al. (2009). "Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors." Bmc Genomics **10**: 135.
57. Saal, L. H., et al. (2007). "Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7564-7569.
58. Dillon, R. L., et al. (2007). "The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer." Oncogene **26**(9): 1338-1345.
59. Castaneda, C. A., et al. (2010). "The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer." Cancer Metastasis Rev **29**(4): 751-759.
60. Korkaya, H., et al. (2009). "Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling." PLoS Biol **7**(6): e1000121.
61. Ressel, L., et al. (2009). "Reduced PTEN Protein Expression and Its Prognostic Implications in Canine and Feline Mammary Tumors." Veterinary Pathology **46**(5): 860-868.
62. Qiu, C. W., et al. (2008). "Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours." Vet Res Commun **32**(6): 463-472.

63. Liu, S. L., et al. (2006). "Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells." Cancer Res **66**(12): 6063-6071.
64. Farnie, G. and R. B. Clarke (2007). "Mammary stem cells and breast cancer--role of Notch signalling." Stem Cell Rev **3**(2): 169-175.
65. Dontu, G., et al. (2004). "Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells." Breast Cancer Research **6**(6): R605-R615.
66. Harrison, H., et al. (2010). "Regulation of Breast Cancer Stem Cell Activity by Signaling through the Notch4 Receptor." Cancer Res **70**(2): 709-718.
67. Barnes, D. M. (1999). "Expression and function of BRCA1 and BRCA2 in familial and sporadic breast cancer." Histopathology **34**(2): 170-174.
68. Liu, S., et al. (2008). "BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(5): 1680-1685.
69. Kote-Jarai, Z. and R. A. Eeles (1999). "BRCA1, BRCA2 and their possible function in DNA damage response." Br J Cancer **81**(7): 1099-1102.
70. Nieto, A., et al. (2003). "BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables." J Comp Pathol **128**(4): 260-268.
71. Jerry, D. J., et al. (2008). "Regulation of cancer stem cells by p53." Breast Cancer Res **10**(4): 304.
72. Setoguchi, A., et al. (2001). "Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs." Am J Vet Res **62**(3): 433-439.
73. Millau, J. F., et al. (2009). "P53 transcriptional activities: a general overview and some thoughts." Mutat Res **681**(2-3): 118-133.
74. Godar, S., et al. (2008). "Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression." Cell **134**(1): 62-73
75. Clarke, R.B. et al. (2000) P27KIP1 expression indicates that steroid receptor-positive cells are a non-proliferating, differentiated subpopulation of the normal human breast epithelium. Eur. J. Cancer **36**,S27–S29
76. Dontu, G., et al. (2004). "Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor." Trends Endocrinol Metab **15**(5): 193-197.
77. Tran, B. and P. L. Bedard (2011). "Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets." Breast Cancer Res **13**(6): 221
78. Honeth, G., et al. (2008). "The CD44(+)/CD24(-) phenotype is enriched in basal-like breast tumors." Breast Cancer Research **10**(3).
79. Dontu, G. (2008). "Breast cancer stem cell markers - the rocky road to clinical applications." Breast Cancer Res **10**(5): 110.
80. Hwang-Verslues, W. W., et al. (2009). "Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers." PLoS One **4**(12): e8377.
81. Pinho, S. S., et al. (2012). "Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis." Transl Res **159**(3): 165-172.