به نام خداوند بخشنده مهربان

سازوکار مولکولی برنامه گذار اپیتلیالی – مزانشیمی (EMT)، از منشاء جنینی تا متاستاز تومورها

یونس کمالی

استادیار گروه علوم آناتومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

youneskml@shirazu.ac.ir

چکیده

چگونه یک تومور اپیتلیال اولیه به مهاجرت و ماهیت تهاجمی دست می یابد و چگونه ماکرومتاستازها در مکان های بافتی خاص تشکیل می شوند؟ چگونه بافت‌های اپیتلیال در پاسخ به آسیب ها دچار فیبروز می شوند؟ بسیاری از پاسخ‌ها به چنین پرسش‌هایی شامل شکل‌پذیری سلولی از طریق یک برنامه تکاملی بسیار حفاظت‌شده به نام گذار اپیتلیالی به مزانشیمی (EMT) است که توسط آن سلول‌های اپیتلیال قطبی و بی‌تحرک به حالت مزانشیمی متحرک تغییر می‌کنند. EMT و فرآیند معکوس، گذار مزانشیمی–اپیتلیالی (MET) نقش اساسی برای مورفوژنز در طی چندین مرحله از تکامل رویانی مانند گاسترولاسیون، تشکیل ستیغ عصبی، تکامل دریچه قلب، تشکیل کام ثانویه و تشکیل اپیتلیوم نفرون در کلیه ایفا می کند. تصور می‌شود که یک EMT/MET نسبی تحت شرایط پاتولوژیک در بافت‌های بالغ دوباره درگیر می‌شود. مسیرهای علامت‌دهی مشابه به صورت القاگرهایی مانند (TGF-β)/مسیر Smads، تنظیم کننده ها (عوامل رونویسی از جمله Snail1/Snail، Snail2/Slug، Twist و ZEB1) و مولکول های عامل مانند ژن های خاصی که پروتئین های اتصال اپیتلیال را کد می کنند در تعدیل برنامه EMT در طول تکامل رویانی و شرایط پاتولوژیک نقش دارند. از این رو، روشن کردن تنظیم مولکولی EMT/MET در طول رویدادهای مورفوژنتیک در کشف مکانیسم‌های دخیل در ایجاد فیبروز اندام و متاستاز تومور بسیار مهم خواهد بود و ممکن است چشم اندازهای جدیدی را به مداخلات درمانی باز کند. این مقاله مروری به طبقه بندی برنامه EMT در تکامل رویان و نقش EMT/MET در پیشرفت سرطان می‌پردازد. علاوه بر این، پیوند EMT با آپوپتوز، پیری، و مقاومت شیمیایی مورد بحث قرار گرفته است.

واژگان کلیدی: گذار اپیتالی–مزانشیمی (EMT)، گذار مزانشیمی–اپیتلیالی (MET)، متاستاز تومور کارسینوما

مقدمه:

انواع سلول های اپیتلیال و مزانشیمی مدت هاست که با مورفولوژی سلولی و سازماندهی منحصر به فردشان در بافت ها شناخته شده اند. سلول های اپیتلیال صفحات پلاریزه یا لایه هایی از سلول ها را تشکیل می دهند که به صورت جانبی از طریق چندین نوع اتصال سلولی از جمله اتصالات چسبنده، دسموزوم ها و اتصالات محکم به هم متصل می شوند. علاوه بر این، سلول های اپیتلیال خود را از طریق همی‌دسموزوم ها به غشای پایه زیرین متصل می کنند تا قطبیت راسی–پایه ای را حفظ کنند. هم دسموزوم ها و همی‌دسموزوم ها بیشتر با رشته های حدواسط سیتوکراتین مخصوص اپیتلیال ارتباط برقرار می کنند. در مقابل، سلول های مزانشیمی خود را در داخل ماتریکس خارج سلولی (ECM) قرار می دهند و به ندرت با سلول های مجاور تماس محکم برقرار می کنند. در طول فرآیندهای مورفوژنز رویانی خاص مانند تشکیل مزودرم و تکامل ستیغ عصبی، سلول‌های اپیتلیال می‌توانند انعطاف پذیری بسیار زیادی از خود نشان دهند و با فعال کردن برنامه گذر اپیتلیال–مزانشیمی (EMT) به حالت مزانشیمی تبدیل شوند. پس از EMT، این سلول‌ها اتصالات اپیتلیالی خود را از دست می دهند و به تولید رشته های ویمنتین روی می‌آورند. مشخصه عملکردی برنامه EMT این است که به سلول های اپیتلیال ثابت اجازه می دهد در طول مورفوژنز تکاملی توانایی مهاجرت و حمله را به دست آورند [12]. اگرچه سلول‌های اپیتلیال در طول EMT تکاملی به حالت مزانشیمی تبدیل می‌شوند، ورود به برنامه EMT لزوماً تعهدی غیرقابل برگشت نیست، همانطور که در طول تشکیل لوله‌های کلیه مشهود است. این سلول های اپیتلیال می توانند یک برنامه EMT موقتی را فعال کنند و سپس تحت یک فرآیند معکوس به نام گذار مزانشیمی–اپیتلیال (MET) قرار گیرند تا مسیر تمایز خود را ادامه دهند [17]. در بسیاری از موارد، شناسایی یک حالت اپیتلیال در مقابل یک حالت مزانشیمی می تواند نسبتاً سیال باشد و یک EMT/MET نسبی اغلب برای انجام وظایف تکاملی منحصر به فرد رخ می دهد. این رویدادهای EMT/MET پویا انعطاف پذیری بزرگ سلول های احتمالاً تمایز یافته را در طول مورفوژنز برجسته می کند. در دهه گذشته، تعداد رو به افزایشی از مطالعات شواهد قوی برای شروع مجدد برنامه تکاملی EMT در پیشرفت سرطان و متاستاز ارائه کرده اند. این برنامه EMT در متاستاز تومور دارای بسیاری از ویژگی های مورفولوژیکی و مولکولی مشابه برنامه EMT تکاملی است. نکته مهم آن است که به دلیل ناهمگونی و ریزمحیط در حال تکامل مداوم در تومورهای انسانی، برنامه EMT در متاستاز با این شرایط سازگار می شود تا به سلول های تومور اجازه دهد تا با موفقیت متاستاز یابند.

در حالی که EMT به عنوان یک برنامه حیاتی در طول تکامل رویانی پذیرفته شده است، نقش آن در متاستاز سرطان مورد بحث بوده است [5].

در سال ۲۰۰۲، Jean Paul Thiery، مدل متاستاز برگشت پذیر EMT را پیشنهاد کرد که در آن سلول‌های تومور اپیتلیال اولیه EMT را برای حمله و انتشار در سراسر بدن فعال می‌کنند، در حالی که، پس از رسیدن به مکان‌های دور، سلول‌های تومور منتشر شده (DTCs) تحت یک فرآیند برگشت یا MET برای تشکیل متاستازهای اپیتلیال قرار می‌گیرند. این فرضیه جالب، تحقیقات EMT را در خط مقدم مطالعه متاستاز سرطان قرار داده است.

EMT اولیه، ثانویه و سوم در طی زندگی داخل رحمی

گذار سلول های اپیتلیال به مزانشیمی برگشت ناپذیر نیست، زیرا چندین دور EMT و MET برای تمایز نهایی انواع سلول‌های تخصصی و به دست آوردن ساختار پیچیده سه بعدی اندام های داخلی ضروری است. بر این اساس، این دورهای متوالی به عنوان EMT اولیه، ثانویه و سوم شناخته می شوند. نمونه‌هایی از EMT اولیه شامل مواردی است که در طی کاشت یا لانه گزینی پستانداران، در حین گاسترولاسیون در متازوئن‌های مختلف و در ستیغ یا تاج عصبی همه مهره‌داران مشهود است. EMT اولیه در مراحل اولیه تکامل رویانی، حتی قبل از لانه گزینی، مانند هنگام تشکیل اندودرم جداری در موش، رخ می دهد. اولین EMT پس از کاشت، آن است که توسط پیش سازهای

مزاندودرم در طی گاسترولاسیون انجام می شود، در حالی که لایه لایه شدن (دلامیناسیون) سلول های ستیغ (تاج) عصبی از لوله عصبی پشتی یک رویداد بعدی است. در آماده سازی برای EMT، مسیرهای علامت‌دهی متعددی به ایجاد یک مرکز سازماندهی کمک می کند که به نوبه خود حرکات مورفوژنتیک و مشخصات را کنترل می‌کند.

دو ژن اصلی حلزون در مهره داران وجود دارد: Snail1 و Snail2 (به نام SNAI1 و SNAI2 در انسان). آنها توسط اعضای ابرخانواده TGFβ القا می شوند و سیگنال دهی FGF برای حفظ بیان آنها و ادامه گاسترولاسیون ضروری است [2]. رویان‌های دارای کمبود حلزون قادر به گاسترولاسیون نیستند و سلول های مزودرمی قادر به تنظیم کاهشی تجمع E-cadherin در خط اولیه نیستند. با توجه به اینکه گاسترولاسیون یک فرآیند بسیار سریع است، تنظیم رونویسی E-cadherin به تنهایی کافی نیست. E-cadherin همچنین در سطح پروتئین توسط پروتئین متقابل P38 (IP)، p38-MAP کیناز و پروتئین FERM (EPB4.1L5) کنترل می شود [19].

سایر عوامل رونویسی مانند Eomesodermin (Eomes) و Mesp1&2 برای EMT در طی گاسترولاسیون موش مهم هستند. Eomes یک فاکتور رونویسی T-box است که در اپی بلاست خلفی قبل از تشکیل خط اولیه، در زمان تشکیل خط اولیه و در مزاندودرم نوپا در هنگام گاسترولاسیون بیان می شود. به نوبه خود، فاکتورهای رونویسی پایه مارپیچ–حلقه–مارپیچ Mesp1&2 نیز در اپی بلاست خلفی جنین موش بیان می شوند. لایه لایه شدن مزودرمی از خط اولیه در موش های فاقد Eomes در اپی‌بلاست و در جهش یافته های Mesp1/Mesp2 مضاعف مسدود شده است [1]. این با توانایی پروتئین های Mesp برای القای حلزون و EMT در سلول های بنیادی جنینی تمایز یافته مطابقت دارد [24].

سلول ها باید غشای پایه را بشکنند تا با موفقیت از خط اولیه اولیه جدا شوند. یک مسیر با واسطه پروتئین RhoGEF Net1 باعث کاهش تنظیمی RhoA در خط اولیه می شود و تعامل بین سلول های اپی بلاست و غشای پایه زیرین را مختل می کند. عوامل حلزون با فعال کردن متالوپروتئازها و با سرکوب برخی از اجزاء مانند Laminin5 و گیرنده های آن، به تخریب غشای پایه کمک می کنند. نکته مهم این است که یکپارچگی غشای پایه باید در نواحی خارج از خط اولیه حفظ شود و به نظر می‌رسد پروتئین گذر غشایی FLRT3 علاوه بر تنظیم سرنوشت سلول، محافظت در برابر اختلال آن را ارائه می دهد.

سلول‌های تاج عصبی در داخل اپیتلیوم عصبی پشتی متحمل برنامه EMT می‌شوند و سلول‌های انفرادی قبل از ایجاد مشتقات مختلف از جمله ساختارهای جمجمه صورتی، بیشتر سیستم عصبی محیطی، برخی از سلول‌های غدد درون ریز و ملانوسیت‌ها مهاجرت می‌کنند. حوزه تاج عصبی توسط مسیرهای علامت‌دهی FGF، Wnt، Notch و رتینوئیک اسید در همکاری با گرادیان‌های مخالف پروتئین مورفوژنتیک استخوان ۴ (BMP4) و آنتاگونیست های آن Noggin، Follistatin و Chordin مشخص می شود. اگرچه علامت‌دهی Wnt متعارف هم برای القا و تثبیت پیش سازهای تاج عصبی و هم برای لایه برداری آنها مهم است، با این حال علامت‌دهی Wnt غیر متعارف برای مهاجرت تاج عصبی مهم است [7]. بنابراین، بیشتر مسیرهای علامت‌دهی درگیر در تعریف حوزه تاج عصبی با مسیرهایی که در حین گاسترولاسیون استفاده می‌شوند، مشترک هستند.

EMT ثانویه: سومیت ها، کام، پانکراس، کبد و دستگاه تولید مثل

EMT های اولیه با رویدادهای تمایز دنبال می شوند که انواع مختلف سلول را تولید می کنند. در واقع، سلول‌های تاج عصبی مهاجر مسیرهای کلیشه‌ای را دنبال می‌کنند و سپس به سلول‌های عصبی، غضروفی یا استخوانی تمایز می‌یابند و سلول‌های مزودرمی پس از گاسترولاسیون به مزودرم محوری، پاراکسیال، حدواسط و جانبی تقسیم می‌شوند. این جمعیت ها از طریق یک فرآیند MET به ساختارهای اپیتلیال گذرا متراکم می شوند و در نتیجه نوتوکورد، سومایت ها، پیش سازهای دستگاه ادراری تناسلی و سوماتوپلور و اسپلنوپلور را تشکیل می دهند. به جز نوتوکورد و در پاسخ به سیگنال‌های از منشاء ریزمحیط خود، سایر اپیتلیوم‌های ثانویه تحت یک EMT ثانویه قرار می‌گیرند تا سلول‌های مزانشیمی با پتانسیل تمایز محدودتری تولید کنند. سرکوب فاکتورهای Snail زمان‌بندی MET مزودرم محوری پیش‌سومایتی را کنترل می‌کند که منجر به اپیتلیال شدن سومایت می‌شود. این اپیتلیال شدن به شدت توسط Rac1 و Cdc42 کنترل می شود (با سطوح بالای Cdc42 که یک فنوتیپ مزانشیمی را ترغیب می کند)، در حالی که مزودرم مجاور محوری با تنظیم سطوح Rac1 فعال شده باعث اپیتلیال شدن می‌شوند. سومایت ها بعداً تحت فرآیندهای EMT ثانویه مختلفی قرار می گیرند. برای مثال، قسمت پشتی سومایت به مزانشیم پوستی تبدیل می‌شود و میوبلاست‌هایی که از میوتوم جدا می‌شوند، به‌عنوان پیش‌ساز سلول‌های ماهیچه‌ای و ماهواره‌ای مشارکت می‌کنند. یک رویداد متمایز EMT در میوتوم‌ها در سطح جوانه‌های اندام محوری رخ می‌دهد که با مهاجرت فعال میوبلاست‌هایی که از نوک میوتوم جدا می‌شوند، پر جمعیت می‌شوند [5].

به نوبه خود، قسمت شکمی سومایت ها به سلول های مزانشیم اسکلروتومی تبدیل می شود که بعداً مهره ها را تشکیل می دهند. القا کننده های تولید شده توسط نوتوکورد و لوله عصبی شکمی این EMT را کنترل می کنند. Noggin، که آنتاگونیست علامت‌دهی BMP است و جوجه تیغی صوتی (SHH) برای القای Pax1، Pax9، و Nkx3.1 به عنوان اولین نشانگرهای سلول های اسکلروتومی مورد نیاز هستند.

مزودرم صفحه جانبی به دو اپیتلیوم که توسط یک حفره به نام سیلوم از هم جدا شده اند متراکم می شود. سلول های اپیتلیوم شکمی، splanchnopleure، متحمل EMT می‌شوند و پیش سازهای اندوکارد، آنژیوبلاست ها و سلول های بنیادی خونساز تولید می کنند. سلول‌های اپیتلیوم پشتی، یعنی سوماتوپلور، عمدتاً مورفولوژی اپیتلیال خود را حفظ می‌کنند، اگرچه برخی سلول‌ها تحت یک EMT بیشتر قرار می‌گیرند تا بافت همبند عضله دیواره بدن را تشکیل دهند. به نظر می رسد مشتقات اندودرمی نیز از EMT در طی تکامل کبد استفاده می کنند، اگرچه این به خوبی در سطح مولکولی مستند نشده است (شکل B۱). سلول های غدد درون ریز پانکراس مشخص شده در جوانه نیز قبل از اینکه متحمل MET شوند تا جزایر لانگرهانس را تشکیل دهند لایه لایه شده و از طریق مزانشیم اطراف مهاجرت می کنند. فرآیندهای EMT همچنین در حین تکامل طبیعی کام ثانویه و دستگاه تناسلی مهم هستند. پس از ادغام اپیتلیوم دو نیمه کام، هنوز مشخص نیست که آیا این سلول ها تحت EMT قرار می گیرند، می میرند یا به اپیتلیوم دهان مهاجرت می کنند.

در دستگاه تناسلی نر، مجرای مولرین پس از EMT ناشی از ماده بازدارنده مولرین به قهقرا می‌روند. علاوه بر این، طناب های بیضه پس از مهاجرت سلول های اندوتلیال مزونفریک به احتمال زیاد پس از انجام EMT یا به طور دقیق تر، گذار اندوتلیال به مزانشیم (EndMT) تشکیل می شوند [10].

EMT اولیه تا دوره سوم در طی تکامل قلب

قلب از طریق سه چرخه متوالی EMT و MET تشکیل می شود. اگرچه سلول‌های مزودرمی قلب در طول EMT در گاسترولاسیون مشخص می‌شوند، پیش‌سازهای قلبی در splanchnopleure به سرعت از طریق MET به یک اپیتلیوم دو لایه

سازمان‌دهی می‌شوند. EMT ثانویه زمانی اتفاق می‌افتد که دو ناحیه قلبی در اطراف روده ابتدایی تا می‌خورند. سلول‌های مزانشیمی ناشی از این لایه‌برداری، پوشش سلول‌های اندوتلیال قلب را از طریق MET دیگری ایجاد می‌کنند و یک لوله اندوکاردی را تشکیل می‌دهند که توسط اپیتلیوم میوکارد احاطه شده است. متعاقباً، این دو لوله متحدالمرکز به چهار بخش اولیه قلب تکامل می یابند. سلول‌های اندوتلیال از کانال دهلیزی تحت یک EMT سوم قرار می‌گیرند (در اینجا به دلیل ماهیت بافت منشا، EndMT نیز نامیده می‌شود)، به ژل قلبی حمله می‌کنند و بالشتک اندوکارد را تشکیل می‌دهند، سلول‌هایی که بعداً در کمپلکس دریچه–سپتال دهلیزی جمع می‌شوند [27].

برنامه مولکولی EMT

با توجه به اینکه تعدادی از مقالات مروری اخیر بر روی مسیرهای مولکولی تنظیم کننده EMT/MET متمرکز شده اند [11, 36]، هدف این بخش ارائه نمای کلی از تعریف سلولی و مولکولی برای EMT/MET و پایه ای برای بحث های دقیق در مورد این مسیرها در زمینه متاستاز تومور است. تغییرات پیچیده مورفولوژیکی و سلولی در طول EMT نیاز به همکاری تعداد زیادی از مسیرهای علامت‌دهی مولکولی و تنظیم کننده دارد. بر اساس عملکرد آنها در طول EMT، به سه گروه دسته بندی می‌شوند: مولکول های اثرگذار که برنامه EMT را اجرا می کنند (اثرگذارهای EMT)، عوامل رونویسی که برنامه EMT را تنظیم می‌کنند (تنظیم‌کننده‌های اصلی EMT)، و محورهای خارج سلولی که برنامه EMT را فعال می‌کنند (القاء کننده‌های EMT).

اثرگذارهای EMT

در طول EMT، اجزای مولکولی کلیدی این ساختارها در معرض سطوح مختلف تنظیم قرار می گیرند. برای مثال، ژن‌های کدکننده پروتئین‌های اتصال اپیتلیال مختلف، مانند E-cadherin، a-catenin و g-catenin، در سطوح mRNA و پروتئین کاهش می‌یابند. در میان آنها، E-cadherin به عنوان دروازه بان حالت اپیتلیال در انواع مختلف سلول های اپیتلیال در نظر گرفته می شود. در طول EMT، سرکوب رونویسی ژن E cadherin [6, 16] ، متیلاسیون پروموتر [31]، فسفوریلاسیون و تخریب پروتئین [22] همگی در پاسخ به سیگنال های القایی مختلف مشاهده شده اند. علاوه بر این، رشته های حدواسط نشان داده شده اند که در طول EMT از سیتوکراتین به ویمنتین تغییر می‌کنند. افزایش سطح ویمنتین همچنین یک نشانگر ثابت در طول رویدادهای مختلف EMT است، در حالی که سوئیچ‌های فرعی سیتوکراتین معمولاً متغیر و نوع بافت خاص هستند. برخی دیگر از مولکول‌های کلیدی اثرگذار EMT پروتئین‌هایی هستند که مهاجرت و تهاجم سلولی را در طول EMT افزایش می‌دهند. فیبرونکتین، یک پروتئین خارج سلولی مورد نیاز برای مهاجرت سلول های مزانشیمی، اغلب با فعال شدن EMT القا می شود. جهت ترغیب تهاجم سلولی از طریق ماتریکس خارج سلولی در طول EMT، یک حلقه اتوکرین گیرنده PDGFR) PDGF/PDGF) فعال می شود تا تخریب ECM با واسطه اینوادوپودیا را ترغیب کند. تعدادی از کادهرین های غیر اپیتلیال، مانند N-cadherin، و پروتئین های سطح سلول، مانند CD44 و integrin b6) القا شده اند و تصور می شود که برای مهاجرت مناسب سلولی حیاتی هستند [3].

تنظیم‌کننده‌های اصلی EMT

گروه اول فاکتورهای رونویسی خانواده انگشت روی حلزون، از جمله Snail1 و Snail2 هستند، که هر دو قادرند مستقیماً به جعبه های E پروموتر E-cadherin متصل شوند تا رونویسی آن را سرکوب کنند. گروه دوم، پروتئین‌های خانواده هومئوباکس Zeb1 و Zeb2 با اتصال E-box مرتبط با انگشت روی هستند که همچنین قادر به سرکوب رونویسی E-cadherin از طریق یک حلقه بازخورد دوگانه منفی کنترل بیان خانواده Zeb1/Zeb2 و miRNA-200 هستند [13]. همچنین نشان داده شده است که هر دو خانواده فاکتورهای رونویسی Snail و Zeb باعث سرکوب دیگر پروتئین های اتصال سلولی مانند کلودین ها و ZO-1 می شوند [34]. گروه سوم، خانواده اصلی فاکتورهای رونویسی مارپیچ–حلقه–مارپیچ (bHLH) هستند، از جمله Twist1، Twist2 و E12/E47 که همگی می توانند EMT را به تنهایی یا به صورت مشارکتی القا کنند. به عنوان مثال، Twist1 نه تنها می تواند E-cadherin را از طریق القای فاکتورهای رونویسی حلزون سرکوب کند، بلکه برنامه های مرتبط با تهاجم تومور را نیز فعال می‌کند [12].

القاگرهای EMT

در طی پیشرفت تومور، القای EMT در سلول‌های تومور احتمالا به دلیل نقش اساسی آنها در مورفوژنز رویانی در ارتباط با تغییرات ژنتیکی فاکتورهای رونویسی اصلی EMT نبوده است. در عوض، تصور می‌شود که سلول‌های کارسینوما در پاسخ به ترکیبی از سیگنال‌های خارج سلولی در ریزمحیط تومور متحمل برنامه EMT می‌شوند. بسیاری از سیگنال های القا کننده EMT تمایل به نوع سلول یا بافت خاص دارند و احتمالاً به همکاری بین مسیرهای متعدد نیاز دارند. همه مسیرهای علامت‌دهی تکاملی اصلی از جمله TGF-b، Wnt، Notch و آبشارهای علامت‌دهی گیرنده فاکتور رشد، در برخی از جنبه های برنامه EMT نقش دارند. مهمتر از همه، به نظر می رسد مسیر TGF-b یک القاء کننده اولیه EMT باشد [21].

در مجموع، برنامه EMT شامل تعداد زیادی تغییرات سلولی و مولکولی است. از آنجایی که سیگنال‌های القاکننده EMT متنوع و اغلب وابسته به زمینه هستند، عوامل EMT و تنظیم‌کننده‌های رونویسی اصلی به‌عنوان نشانگرهای مولکولی EMT در سرطان‌های انسانی بیشترین استفاده را دارند.

EMT/MET در متاستاز تومور

تصور می شود که فرآیند متاستاتیک شامل چندین مرحله است. مرحله اول: تهاجم– فرار اولیه از محل اولیه مستلزم آن است که سلول های تومور اپیتلیال متحرک شوند و غشای پایه زیرین و ECM را تخریب کنند. با شکستن این موانع شروع به تهاجم به پارانشیم بافت مجاور می کند. مرحله بعدی متاستاز، داخل عروقی نامیده می شود که طی آن سلول های تومور به لایه اندوتلیال حمله می کنند و به داخل خون یا عروق لنفاوی نفوذ می کنند و در نتیجه وارد گردش خون سیستمیک می شوند. مرحله سوم: انتقال سیستمیک، هنگامی که در گردش خون، تنها تعداد کمی از سلول های نئوپلاستیک منتشر شده به نظر می رسد قادر به زنده ماندنی در گردش خون دارند. در نهایت، برخی از سلول های باقی مانده ممکن است در مجرای عروقی متوقف شوند و از طریق اندوتلیوم مویرگی به داخل پارانشیم اندام های دور وارد شوند (مرحله چهارم: برون

ریزی). مرحله پنجم: تشکیل کلونی، در محیط جدید استرومایی، حتی یک زیرمجموعه کوچکتر از سلول های تومور، میکرومتاستازهایی را با پتانسیل تکثیر به تومورهای کاملاً بدخیم و ثانویه ایجاد می کنند که از نظر بالینی قابل تشخیص هستند و در نهایت تهدید کننده حیات هستند [14].

مرحله اول: EMT در تبدیل بدخیمی تومورها و تهاجم موضعی

چندین مطالعه نقش احتمالی فاکتورهای رونویسی هسته EMT را در تبدیل بدخیم اولیه دخیل کرده‌اند. بیان mRNA ژن Twist1 در هیپرپلازی مجرای آتیپیک، مرحله بسیار اولیه توسعه تومور اولیه پستان در مدل تومور موش MMTV-Neu شناسایی شد [20]. همچنین نشان داده شد که Twist1 پیری و آپوپتوز ناشی از انکوژن را با اتصال به p53 و ترغیب تخریب آن لغو می‌کند. با مهار p53، Twist1 قادر به همکاری با انکوژن هایی مانند Her2 و H-ras برای ترغیب تبدیل شدن به بدخیمی بود که نقش بالقوه ژن های EMT را در شروع تومور نشان می دهد.

فعال‌سازی EMT این امکان را به سلول‌های سرطانی می‌دهد تا از طریق از دست دادن اتصالات سلولی و جدا شدن از یکدیگر برای مهاجرت و تهاجم تک سلولی آماده گردند. به عنوان مثال، فعال شدن مسیر TGF-b در سلول‌های سرطان پستان موش EpH4-Ras منجر به از بین رفتن اتصالات چسبنده با واسطه E-cadherin و افزایش نشان‌گرهای مزانشیمی در کشت سلولی و پیوندهای تومور موش شد [28]. در مجموع، این مطالعات به شدت از نقش EMT در ترویج تهاجم تک سلولی در تومورهای اولیه حمایت می کنند.

تخریب ماتریکی خارج سلولی (ECM)

مطالعات نشان می‌دهد که برنامه EMT نه تنها به سلول‌های سرطانی اجازه می‌دهد از یکدیگر جدا شوند، بلکه توانایی تخریب ECM را برای تهاجم تک سلولی برای شروع آبشار متاستاتیک فراهم می‌کند. تهاجم سرطان به سلول های تومور نیاز دارد تا توانایی تخریب غشای پایه زیرین و ECM را به دست آورند. برنامه EMT از طریق افزایش تنظیم آنزیم های مختلف تخریب ماتریس توسط تنظیم کننده های اصلی EMT در این فرآیند نقش دارد. یک تداخل احتمالی بین از دست دادن اتصالات سلولی و القای پروتئازها در طول EMT برای ترویج تهاجم تومور لازم است. اخیراً، شواهد نوظهوری وجود دارد که فاکتورهای رونویسی EMT همچنین می توانند باعث ایجاد ساختارهای زیر سلولی تخصصی به نام invadopodia برای حمله به ECM های موضعی شوند. Invadopodia برآمدگی های بر پایه اکتین هستند که پروتئازهای مختلفی مانند MT-MMPs، ADAMs و MMPs و غیره را به نقاط تماس سلول–ماتریکس برای تخریب ECM جذب می‌کنند [26].

مرحله دوم: EMT در نفوذ سلول های توموری به عروق خونی یا لنفی

پس از تهاجم موضعی، سلول‌های تومور برای انتشار سیستمیک باید تحت یک فرآیند داخل رگی قرار گیرند تا وارد عروق (رگ‌های لنفاوی یا خونی) شوند. مکانیسم دقیق چگونگی عبور سلول های تومور از سد اندوتلیال تا حد زیادی ناشناخته است. به دلیل اندازه آنها، سلول های تومور ممکن است نیازمند تشکیلات اضافی برای نفوذ به داخل رگ باشند که این بر خلاف لکوسیت های با اندازه کوچکتر است که برای مهاجرت بین سلول های اندوتلیال (EC) به دیاپدز متکی هستند. تصور می‌شود که برنامه EMT ویژگی‌های مهاجرتی و تهاجمی سلول‌های سرطانی را تعدیل می‌کند تا نفوذ به عروق را تقویت کند. احتمالاً تماس مستقیم بین سلول های تومور و اندوتلیوم برای نفوذ به داخل رگ مورد نیاز است [29].

مرحله سوم: EMT در انتقال جریان سیستمیک

پس از ورود به گردش خون سیستمیک، سلول‌های تومور زنده‌مانده باید دارای تشکیلات مناسب برای زنده ماندن از آنویکیس باشند و سپس به دیواره عروق خونی متصل شوند تا برای خارج شدن از گردش خون آماده شوند. بسیاری از مطالعات اخیر در بیماران سرطانی انسانی و مدل‌های تومور موش، حضور نشان‌گرهای مولکولی EMT را در سلول‌های توموری جریان خون با استفاده از روش‌های مختلف، از جمله رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، هیبریداسیون درجا، تعیین توالی RNA، PCR کمی در زمان واقعی و آنالیز بیان ژن شناسایی کرده‌اند [35]. بقای سلول‌های توموری جریان خون ممکن است توسط برجستگی های غشایی مبتنی بر میکروتوبول به نام ریز شاخک ها تقویت شود که تصور می شود امکان تجمع آن‌ها و یا اتصال سلولی به دیواره خون را می‌دهد. بیان Twist1 یا Snail1 در سلول‌های اپیتلیال پستان انسان، تشکیل ریز شاخک‌ها را در سلول‌های جدا شده افزایش می‌دهد که نشان می‌دهد EMT می‌تواند به بقای سلول‌های توموری جریان خون از طریق اتصال آن‌ها مبتنی بر ریز شاخک‌ها به لکوسیت‌ها، پلاکت‌ها و اندوتلیوم کمک کند.

مرحله چهارم: EMT در برون ریزی سلول های تومور

مطالعات نشان داده اند که برون ریزی سلول‌های توموری از جریان سیستمیک یک فرآیند نسبتاً سریع است (یعنی سلول های تومور ۱–۲ روز پس از تزریق ورید دم خارج می شوند) [7]. با این حال، ارزیابی ورید دم شامل تزریق تعداد زیادی سلول تومور به طور مستقیم به گردش خون است. این سلول‌های تومور تزریقی با تعداد بی شماری به ریز عروق ریه می‌رسند که این فرآیند اغلب منجر به رشد این سلول‌ها در داخل عروقی می‌شود تا اینکه مرحله بعدی رشد تومور در پارانشیم بافتی پس از خارج شدن سلول‌های تومور. مشخص شده است که بیان Twist1 در سلول های تومور پستان باعث افزایش برون رفتگی سلول های تومور از طریق مکانیسم مستقل از اینتگرین b1 می شود. علاوه بر این، سلول‌های بیانگر Twist1 برجستگی‌های غشایی دینامیکی بزرگی را در طی برون ریزی تشکیل دادند. جالب توجه است که Shibue و همکاران (۲۰۱۲) دریافتند که سلول های توموری با رسیدن به پارانشیم بافت‌های دوردست، برآمدگی های فیلوپودیوم مانند (FLPs) را نشان می دهند که حاوی اینتگرین b1 برای تعامل با ماتریکی خارج سلولی (ECM) است. نه تنها تشکیل FLP برای متاستاز موفقیت آمیز ضروری بود، بلکه توانایی سلول های مختلف تومور پستان برای تولید FLP با حالت های مزانشیمی آنها در ارتباط بود و تشکیل آنها را می توان با بیان Twist1 و Snail1 القا کرد [32].

مرحله پنجم: معکوس شدن برنامه EMT در کلونیزاسیون متاستاتیک

همانطور که بحث شد، کارسینوم های اولیه و سلول‌های توموری جریان خون مارکرهای سلولی و مولکولی قوی EMT را نشان می‌دهند. در مقابل، ماکرومتاستازهای حاصل تا حد زیادی اپیتلیال هستند که نشان می‌دهد درگیری EMT در طول متاستاز احتمالاً پویا است. چائو و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که تزریق سلول های مزانشیمی MDA-MB-231 به داخل ورید دم در محیط اندام ثانویه منجر به بیان مجدد E-cadherin از طریق از دست دادن غیرفعال متیلاسیون در پروموتر E-cadherin شد [8].

Bonnomet و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از ویمنتین به عنوان نشانگر مزانشیمی، دریافتند که بیگانه‌گرافت‌های تومور اولیه MDA-MB-468 و متاستازهای ریوی حاصل، الگوی بیان ناهمگنی از ویمنتین را نشان می‌دهند، در حالی که سلول‌های توموری جریان خون سطوح بالایی از ویمنتین، حلزون ۱ و حلزون ۲ را بیان می‌کنند. این نشان می دهد که سلول‌های توموری جریان خون مثبت ویمنتین ممکن است تحت MET قرار گرفته باشند تا ماکرومتاستاز منفی ویمنتین ایجاد کنند. دو مطالعه اخیر داده های تجربی عینی را برای حمایت از چنین پلاستیسیته اپیتلیال–مزانشیمی در طول متاستاز تومور ارائه کرده اند. این مطالعات به شدت استدلال می کنند که معکوس شدن EMT برای کلونیزاسیون متاستاز ضروری است [4].

چرا سلول های تومور باید به حالت اپیتلیال برگردند تا به ماکرومتاستاز تبدیل شوند؟ مطالعات در کشت سلولی نشان داد که القای EMT توسط Snail1 و Zeb2 به طور مستقیم تقسیم سلولی را با مهار فعالیت Cyclin D سرکوب می کند [25]. در یک مدل تومور پوستی in vivo، فعال‌سازی Twist1 با کاهش تکثیر سلول‌های تومور مرتبط بود [33]. از آنجایی که کلونیزاسیون به سلول‌های تومور نیاز دارد تا تکثیر را پس از خارج شدن در یک ریزمحیط خارجی دوباره شروع کنند، ممکن است برای ایجاد چنین مزیت رشدی نیاز به معکوس شدن EMT باشد. در حالی که این مطالعات نشان می‌دهد که القای تکثیر احتمالاً نقش کلیدی در معکوس شدن EMT در طول کلونیزاسیون دارد. این که کدامیک از مسیرهای علامت‌دهی، EMT را با تکثیر سلولی مرتبط می‌کند، بی‌پاسخ باقی می‌ماند. مطالعات دیگر نشان می دهد که تنظیم کننده های EMT ممکن است کمک بیشتری برای کلونیزاسیون متاستاتیک ارائه دهند. سوال بی پاسخ دیگر این است که چگونه فرآیند معکوس شدن EMT در اندام های دور اتفاق می افتد. به عبارت دیگر: آیا عدم وجود سیگنال القا کننده EMT برای معکوس شدن EMT کافی است؟ آیا سیگنال های القایی MET اضافی برای ترغیب فعال MET مورد نیاز است؟ مطالعات اخیر نشان می دهد که هر دو سناریو در ترغیب معکوس شدن EMT امکان پذیر است. در مدل تومور پوست، فقدان سیگنال Twist1 (یا خروج سیگنال فعال کننده Twist1) در DTC ها منجر به تشکیل ماکرومتاستاز شد [33] .با این حال، این مطالعه این احتمال را رد نمی کند که سیگنال های القایی MET اضافی نیز ممکن است به کلونیزاسیون کمک کنند. گائو و همکاران [15] نشان داد که بیان versican توسط سلول‌های میلوئید در آشیانه متاستاتیک ریه، کلونیزاسیون ریه را با القای MET ترغیب می‌کند، بنابراین از این ایده حمایت می‌کند که ورودی‌های سیگنال از آشیانه متاستاتیک می‌تواند انعطاف‌پذیری اپیتلیال–مزانشیمی را در مکان‌های دور تنظیم کند. این امکان وجود دارد که سیگنال های ریزمحیطی به این miRNA ها برخورد کنند تا EMT را در اندام های دور خاموش کنند.

مشاهدات بالینی نشان می‌دهد که DTC ها می توانند سال ها قبل از رشد مجدد "خفته" باقی بمانند که به پیچیدگی کلونیزاسیون متاستاتیک افزوده می شود. تصور می شود که این سلول ها در پارانشیم بافت ثانویه به عنوان یک ضایعه میکرومتاستاتیک یا در مغز استخوان قرار دارند و

قبل از رشد مجدد به مکان های ثانویه حرکت می کنند [18]. با توجه به عدم وجود نشانگرهای مولکولی خاص برای شناسایی و جداسازی میکرومتاستازهای خفته از اندام های اپیتلیال در بیماران سرطانی و مدل های تومور موش، درک فعلی از خواب تومور عمدتاً بر اساس میکرومتاستازهای جدا شده از مغز استخوان است. مهمتر از همه، همراه با این تصور که معکوس شدن EMT برای کلونیزاسیون ماکرومتاستاز مورد نیاز است، پیشنهاد می‌شود که ناتوانی در برگرداندن EMT در DTCها ممکن است به خواب متاستاز کمک کند.

EMT و مقاومت دارویی

یکی از موانع اصلی در درمان سرطان این است که بیماران سرطانی می توانند در طول زمان نسبت به درمان مقاومت کنند. تعداد فزاینده ای از گزارش ها نقش بالقوه EMT را در ایجاد مقاومت دارویی نشان می دهد. مطالعات با استفاده از رده های سلولی کولورکتال نشان داده است که بیان القاگرهای EMT Snail1 یا TGF-b در سلول های SMAD4-null باعث افزایش مقاومت در برابر شیمی درمانی می شود [30]. مطالعات به شدت نشان می دهد که فعال سازی EMT به مقاومت در برابر سرطان کمک می کند.

در نهایت، جلوگیری از معکوس شدن برنامه EMT در میکرومتاستازهای خفته، یک رویکرد جدید برای جلوگیری از احیای سلول‌های تومور خفته است. در آینده نزدیک، بهبود درک ما از تنظیم مولکولی برنامه‌های EMT/METی پویا در طی متاستاز تومور به ارائه درمان مؤثر در جهت ریشه‌کن کردن بیماری‌های متاستاتیک کمک خواهد کرد.

منابع

1. Arnold, S.J., Hofmann, U.K., Bikoff, E.K., and Robertson, E.J. (2008). Pivotal roles for eomesodermin during axis formation, epithelium-to-mesenchyme transition and endoderm specification in the mouse. Development *135*, 501–511.
2. Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. Development *132*, 3151–3161
3. Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, Sheppard D, Oettgen P, Mercurio AM. 2005. Transcriptional activation of integrin b6 during the epithelial–mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. J Clin Invest 115: 339–347.
4. Bonnomet A, Syne L, Brysse A, Feyereisen E, Thompson EW, Noel A, Foidart JM, Birembaut P, Polette M, Gilles C. 2012. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. Oncogene 31: 3741–3753.
5. Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., and Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. J. Anat. *202*, 59–68

6. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. 2000. The transcription factor snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. Nat Cell Biol 2: 76–83
7. Carmona-Fontaine, C., Matthews, H.K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G.A., Parsons, M., Stern, C.D., and Mayor, R. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. Nature *456*, 957–961.
8. Chao YL, Shepard CR, Wells A. 2010. Breast carcinoma cells reexpress E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. Mol Cancer 9: 179.
9. Chui MH. 2013. Insights into cancer metastasis from a clinicopathologic perspective: Epithelial–mesenchymal transition is not a necessary step. Int J Cancer 132: 1487–1495.
10. Combes, A.N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., and Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. Dev. Biol. *326*, 112–120.
11. De Craene B, Berx G. 2013. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. Nat Rev Cancer 13: 97–110
12. Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, Kim J, Danis E, Ohno-Machado L, Yang J. 2011. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. Cancer Cell 19: 372–386
13. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R. 2005. dEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. Oncogene 24: 2375– 2385.
14. Fidler IJ. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: The 'seed and soil' hypothesis revisited. Nat Rev Cancer 3: 453–458.
15. Gao D, Joshi N, Choi H, Ryu S, Hahn M, Catena R, Sadik H, Argani P, Wagner P, Vahdat LT, et al. 2012. Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition. Cancer Res 72: 1384–1394.
16. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. 2002. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. Cancer Res 62: 1613–1618
17. Hay ED. 1995. An overview of epithelio–mesenchymal transformation. Acta Anat (Basel) 154: 8–20.
18. Hedley BD, Chambers AF. 2009. Tumor dormancy and metastasis. Adv Cancer Res 102: 67–101.
19. Hirano, M., Hashimoto, S., Yonemura, S., Sabe, H., and Aizawa, S. (2008). EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. J. Cell Biol. *182*, 1217–1230.
20. Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmuller G, et al. 2008. Systemic spread is an early step in breast cancer. Cancer Cell 13: 58–68.
21. Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. 2013. TGF-b signaling and epithelial–mesenchymal transition in cancer progression. Curr Opin Oncol 25: 76–84.
22. Lester RD, Jo M, Montel V, Takimoto S, Gonias SL. 2007. uPAR induces epithelial–mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. J Cell Biol 178: 425–436
23. Lim J, Thiery JP. 2012. Epithelial–mesenchymal transitions: Insights from development. Development 139: 3471–3486
24. Lindsley, R.C., Gill, J.G., Murphy, T.L., Langer, E.M., Cai, M., Mashayekhi, M., Wang, W., Niwa, N., Nerbonne, J.M., Kyba, M., et al. (2008). Mesp1 coordinately regulates cardiovascular

fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs. Cell Stem Cell *3*, 55–68.

25. Mejlvang J, Kriajevska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Berx G, Mellon JK, Tulchinsky E. 2007. Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. Mol Biol Cell 18: 4615–4624
26. Murphy DA, Courtneidge SA. 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: Characteristics, formation and function. Nat Rev Mol Cell Biol 12: 413–426.
27. Nakajima, Y., Yamagishi, T., Hokari, S., and Nakamura, H. (2000). Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). Anat. Rec. *258*, 119–127.
28. Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. 1996. TGF-b1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. Genes Dev 10: 2462–2477.
29. Ota I, Li XY, Hu Y, Weiss SJ. 2009. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. Proc Natl Acad Sci 106: 20318–20323.
30. Papageorgis P, Cheng K, Ozturk S, Gong Y, Lambert AW, Abdolmaleky HM, Zhou JR, Thiagalingam S. 2011. Smad4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer. Cancer Res 71: 998–1008.
31. Saito Y, Takazawa H, Uzawa K, Tanzawa H, Sato K. 1998. Reduced expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma: Relationship with DNA methylation of 59 CpG island. Int J Oncol 12: 293–298.
32. Shibue T, Brooks MW, Inan MF, Reinhardt F, Weinberg RA. 2012. The outgrowth of micrometastases is enabled by the formation of filopodium-like protrusions. Cancer Discov 2: 706–721.
33. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. 2012. Spatiotemporal regulation of epithelial–mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. Cancer Cell 22: 725–736.
34. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Berx G. 2005. SIP1/ ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. Nucleic Acids Res 33: 6566–6578
35. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. 2011. Circulating tumor cells: Approaches to isolation and characterization. J Cell Biol 192: 373–382.
36. Zheng H, Kang Y. 2013. Multilayer control of the EMT master regulators. Oncogene doi: 10.1038/onc.2013.128