

INVESTIGAREA VALORILOR SERICE ALE TWIST 1 ÎN MELANOMUL MALIGN

INVESTIGATION OF TWIST 1 SERUM LEVELS IN MALIGNANT MELANOMA

ALECU MIHAIL*,**, GABRIELA COMAN*, MIRELA PETRESCU*, OANA ANDREIA COMAN*,***

Rezumat

Tranziția epitelial mezenchimală reprezintă un proces celular în care celulele epiteliale își pierd fenotipul epitelial și capătă pe cel mezenchimal. Principala consecință a acestui proces este ruperea legăturilor intercelulare, celula crescându-și motilitatea individuală.

TWIST 1 reprezintă un factor de transcripție care inițiază acest proces favorizând metastazarea tumorală.

În studiul nostru am investigat un număr de 20 de pacienți cu melanom malign dintre care 12 cu tumoră primară (Clark IV-V, Breslow peste 1, Ki67 peste 60% și 8 pacienți cu tumoră primară și adenopatie regională. S-a investigat prin metoda ELISA valoarea serică a TWIST1.

Rezultatele au evidențiat creșterea valorilor TWIST1 la 18/20 pacienți investigați cu valori de aproximativ 2 ori față de valorile lotului martor. Pacienții cu tumoră primară și adenopatie 8/20 au prezentat toți valori serice crescute ale TWIST1 cu o creștere de aproximativ trei ori față de valorile normale.

Valorile serice crescute ale TWIST1 evidențiate în stările inițiale ale tumorii se asociază markerilor biologici cunoscuți în melanom (nivelul de invazie Clark, nivelul Breslow, Ki67), cu mențiunea că aceste valori pot avea o evoluție variabilă în timp.

Cuvinte cheie: EMT, TWIST1, melanom.

Summary

Epithelial mesenchymal transition is a cellular process in which epithelial cells lose their epithelial phenotype and acquire the mesenchymal phenotype. The main consequence of this process is the destruction of intercellular junctions with increased individual cell motility.

TWIST1 is a transcription factor that initiates this process, favoring tumor metastasis.

In our study we investigated a total of 20 patients with malignant melanoma, of which, 12 with primary tumor (Clark IV-V, Breslow over 1, Ki67 positive 60%) and 8 patients with primary tumor and regional lymphadenopathy. TWIST 1 levels in the serum were investigated by ELISA.

Our results showed increased values of TWIST1 in the serum of 18 patients from the 20 that we investigated, with values approximately 2 times higher compared to control. Patients with primary tumor and lymphadenopathy 8/20, showed elevated levels of TWIST1, an increase of about three times the normal values.

Elevated serum levels of TWIST1 highlighted in the initial states of tumor are correlated with melanoma biomarkers (Clark level of invasion, Breslow level, Ki67), noting that these values can have a variable evolution over time.

Key words: EMT, TWIST1, melanoma.

Intrat în redacție: 4.05.2016

Acceptat: 3.06.2016

Received: 4.05.2016

Accepted: 3.06.2016

* Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. Victor Babeș”, București.
Department of Dermatology, “Titu Maiorescu” University, Bucharest.

** Universitatea Titu Maiorescu, Facultatea de Medicină, Dermatologie, București.
Department of Dermatology, “Titu Maiorescu” University, Bucharest.

*** Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” Dermatologie, București.
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, “Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, Bucharest.

Tranziția epitelial mezenchimală (EMT) reprezintă un proces fiziologic în care celulele epiteliale își pierd fenotipul epitelial și capătă fenotipul mezenchimal [1,2]. Există și procesul invers de tranziție mezenchimal-epitelială. EMT este întâlnit ca proces fiziologic în cursul dezvoltării embrionare (migrarea melanoblastelor din creasta neurală către piele) sau în cursul vindecării rănilor sau în condiții patologice în carcinogeneză și metastazare dar și în procesele de fibrozare de la nivelul ficatului și rinichiului [3].

Schimbarea fenotipului din celule epiteliale în celule mezenchimale sau prezentarea de caracteristici mezenchimale de către alte tipuri de celule se face prin reprogramarea expresiei a numeroase gene care duc la schimbări la nivelul căilor de semnalizare, cu schimbarea cito-scheletului celulelor intrate în EMT[4].

Cea mai importantă schimbare a celulelor intrate în EMT este distrugerea legăturilor intercelulare cu creșterea motilității individuale a celulelor[1].

Principala proteină de adeziune distrusă este E-cadherina, proteină transmembranală care realizează legături intercelulare prin legarea cu un capăt intracelular de filamentele de actină și cu un capăt extracelular de proteinele similare ale celulelor vecine [5]. Se distruge și alte proteine din clasa cadherinelor : plakogliadină, desmogleină 1 și desmogleină 3 sau proteine care participă la legăturile tight și gap (occludine, claudine, conexine). O serie de proteine de adeziune cum ar fi plakogliadinele nu au numai rol în menținerea unei diferențieri normale a keratinocitelor [3,5,6].

Inițierea EMT se realizează prin intermediul a TGFβ care acționează asupra unor factori de transcripție dintre care cei mai importanți sunt SNAIL, ZEB și TWIST1. Acești factori de transcripție, translocați în nucleu acționează asupra unor gene implicate în EMT. Are loc o redirecționare a proceselor genetice care acționează asupra cito-scheletului și proteinelor care efectuează legăturile intercelulare. Are loc o supresie a genelor care produc E cadherina, claudina, occludina, desmoplakina, placofilina, proteine care intră în componența joncțiunilor intercelulare epiteliale. Totodată are loc o creștere a expresiei proteazelor și activarea acestora cu

The epithelial mesenchymal transition (EMT) is a physiological process in which epithelial cells lose their epithelial phenotype and acquire the mesenchymal phenotype [1,2]. There is also the reverse process, mesenchymal-epithelial transition. EMT is met as a physiological process during embryonic development (melanoblasts migration from the neural crest to the skin), during wound healing or in pathologic conditions, such as carcinogenesis and metastasis, but can also be met in fibrosis of the liver and kidney [3].

Changing phenotype, from epithelial cells to mesenchymal cells or owning mesenchymal features by other types of cells, is done by reprogramming the expression of numerous genes which leads to changes in the signaling pathways and furthermore in changes of the cytoskeleton of the cells that entered EMT[4].

The most important change of the cells that entered EMT is the destruction of intercellular junctions with increased individual cell motility [1].

The main destroyed adhesion protein is E-cadherin, a transmembrane protein that forms intercellular links by tying an intracellular end with actin filaments and an extracellular end with proteins similar to those of neighboring cells [5]. There are also cadherin class proteins that are being destroyed: plakogliadin, desmoglein 1 and desmoglein 3 or proteins involved in tight and gap junctions (occludine, claudine, connexin). A number of adhesion proteins, such as plakogliadins do not only play a role in maintaining the normal differentiation of keratinocytes [3,5,6].

EMT initiation is made through TGFβ which acts on some transcription factors, of which the most important are SNAIL, ZEB and TWIST. These transcription factors, translocated to the nucleus, act on some of the genes involved in EMT. There is a redirection of genetic processes that act on the cytoskeleton and proteins that perform intercellular connections. There's a suppression of the genes that produce E-cadherin, claudin, occludin, desmoplakin, placophyllin, proteins that are part of the epithelial intercellular junctions. At the same time there is an increase of expression of proteases and activation with destruction of

distrucția proteinelor de adeziune . E-cadherina este înlocuită cu R-cadherina ceea ce scade capacitatea de adeziune a celulelor [1,2,4].

TWIST reprezintă unul dintre cei mai importanți factori de transcripție în EMT. Structural, acesta este alcătuit din două alfa helixuri separate printr-o bandă interhelicală cu care se prinde de ADN. Capătul C-terminal este responsabil de activitatea de transcripție. TWIST se prezintă sub două forme TWIST 1 și TWIST 2, între ele existând diferențe semnificative privind efectele biologice [7,8,9].

La vertebrate TWIST se găsește în țesutul embrionar în special la nivelul crestei neurale favorizând migrarea mieloblastelor în piele. Nu se găsește în țesuturile adulte sănătoase dar genele care îl produc se activează în cursul carcinogenezei [10,11].

Mutațiile de la nivelul genelor TWIST produc perturbări ale dezvoltării embrionare iar în absența TWIST, embrionii de șoarece mor în primele stadii de viață [7].

TWIST induce EMT favorizând pierderea polarității celulare, modificarea citoscheletului și scăderea adeziunii celulare prin scăderea producției de E-cadherină.

Este foarte posibil ca TWIST să promoveze proliferarea tumorală prin activarea genelor c-myc sau prin acțiune asupra genelor antiapoptotice [2].

În procesele tumorale, TWIST, în special TWIST1, este exprimat în diverse tipuri de cancere: gastric, pulmonar, melanom, cancer de sân, prostată [7].

Principalul mecanism de acțiune este reducerea E-cadherinei, la care se adaugă creșterea angiogenezei, favorizarea apariției de celule stem [4].

În studiul nostru am investigat valorile serologice ale TWIST 1 în mai multe forme clinice de melanom malign, atât în cazul tumorilor primare, fără adenopatie, cât și în cazul tumorilor cu adenopatie regională.

Pacienți și investigații

Au fost luați în studiu 20 de pacienți cu diagnosticul de melanom malign (clinic și histopatologic) dintre care 12 bărbați și 8 femei cu vârsta cuprinsă între 47 și 72 de ani.

adhesion proteins. E-cadherin is replaced with P-cadherin which decreases cell adhesion ability [1,2,4].

TWIST is one of the most important transcription factors in EMT. Structurally it consists of two alpha helices separated by an interhelix band that binds it with the DNA. The C-terminus end is responsible for the transcriptional activity. TWIST is presented in two forms TWIST 1 and TWIST 2, each with significant differences on biological effects [7,8,9].

In vertebrates, TWIST is found in embryonic tissue, especially in the neural crest, favoring the migration of myeloblasts into the skin. It is not found in healthy adult tissues, but the genes that encode TWIST activate during carcinogenesis [10,11].

Mutations in TWIST genes disturb the embryonic development and in the absence of TWIST, mouse embryos die in the early stages of life [7].

TWIST induces EMT, favoring cell polarity loss, modification of the cytoskeleton and decreased cell adhesion by decreasing the production of E-cadherin.

It is very possible that TWIST could promote tumor proliferation by activating c-myc genes or by acting on antiapoptotic genes [2].

In tumor processes, TWIST, especially TWIST1 is expressed on various types of cancers: gastric, lung, melanoma, breast cancer, prostate [7].

The main mechanism of action is reduction of E-cadherin, which is added to increased angiogenesis, promoting the emergence of stem cells [4].

In our study, we investigated the serum values of TWIST 1 in several clinical forms of malignant melanoma, in both primary tumors without lymphadenopathy and in tumors with regional lymphadenopathy.

Patients and investigations

We included in the study 20 patients, with the diagnosis of malignant melanoma (clinical and histopathologically) of which 12 men and 8 women, aged between 47 and 72 years.

These patients were divided into several categories:

Acești pacienți au fost împărțiți în mai multe categorii:

- pacienți cu tumoră primară ($T_1N_0M_0$) dintre care 7 cazuri cu melanom nodular și 5 cazuri de melanom superficial extins.
 - pacienți cu tumoră primară și adenopatie $T_1N_1M_0$ respectiv un număr de 8 pacienți
- Toți pacienții au fost investigați histopatologic și imunohistopatologic. În toate cazurile nivelul Clark a fost de IV-V iar indicele Breslow peste 1mm. MelanA și HMB45 au fost pozitive, iar Ki67 pozitiv în peste 60% din cazuri.

Investigația s-a efectuat la prezentare, înainte de intervenția chirurgicală în absența oricărui tratament (interferon, citostatice).

S-a investigat nivelul seric al TWIST1 prin metoda ELISA. Valorile normale de 20 pg/ml au fost stabilite prin investigarea unui lot de 20 indivizi sănătoși.

În afară de lotul de studiu de 20 de pacienți cu melanom malign, s-a efectuat investigarea valorilor serice ale TWIST1 la 8 pacienți care au avut melanom malign fără metastaze și au fost operați în urmă cu 1-2 ani (5 formă nodulară, 3 formă superficială cu Clark IV-V și Breslow). În momentul examinării acești pacienți nu prezentau metastaze.

Rezultate

Investigarea TWIST1 în ser la lotul de studiu a evidențiat valori crescute în 18 cazuri, în medie de 47 pg/ml (lotul martor 20 pg/ml).

În cazul pacienților cu tumori primare ($T_1N_0M_0$) respectiv 12 cazuri, media valorilor TWIST1 a fost de 42,5 pg/ml. Din acest lot, din 7 pacienți cu melanom nodular, 6 au prezentat valori crescute, medie 48 pg/ml și 1 pacient cu valoare normală. La pacienții cu melanom superficial, 5 cazuri, 4 au prezentat valori crescute, medie 37pg/ml iar un pacient a prezentat valoare normală.

În cazul pacienților cu adenopatie ($T_1N_1M_0$), din 8 cazuri investigate, toți pacienții au prezentat valori crescute la determinarea TWIST1, medie 56pg/ml (valori cuprinse între 46pg/ml și 72pg/ml).

Din lotul de 8 pacienți cu melanom malign operat în urmă cu 1-2 ani și fără tumoră, metastaze și tratament în momentul investigației,

- patients with primary tumor ($T_1N_0M_0$) of which 7 cases with nodular melanoma and 5 cases of superficial spreading melanoma;
- patients with primary tumor and lymphadenopathy ($T_1N_1M_0$), respectively a total of 8 patients.

All patients had histopathological and immunohistopathological tests. In all cases the Clark level was IV-V and Breslow index over 1mm. MelanA and HMB45 were found positive and Ki67 was positive in over 60% of all cases.

The investigation was performed at presentation, prior to surgery, in the absence of any treatment (interferon, chemotherapy).

TWIST1 levels in the serum was investigated by ELISA. Normal values of 20 pg / ml were established by investigating a group of 20 healthy individuals.

Apart from the study lot of 20 patients with malignant melanoma, serum levels of TWIST1 were performed in 8 patients that had malignant melanoma, 1-2 years ago (5 nodular, 3 superficial with Clark IV-V and Breslow over 1mm), excised and without metastases until the study.

Results

The investigation of TWIST1 in the serum of the study group showed to be increased in 18 cases, an average of 47 pg / ml (the control group 20 pg / ml).

In patients with primary tumors ($T_1N_0M_0$), respectively 12 cases, TWIST1 average was 42.5 pg / ml. Of this group, 7 patients with nodular melanoma, 6 had elevated values, an average of 48 pg / ml and 1 patient had normal value. Patients with superficial melanoma, a total of 5 cases, had elevated values in 4 cases, an average of 37pg / ml and 1 case with normal value.

In patients with lymphadenopathy ($T_1N_1M_0$), from 8 investigated cases, all had increased TWIST1, average 56pg / ml (range between 46pg / ml and 72pg / ml).

From 8 patients with malignant melanoma operated 1-2 years ago, with no tumor or metastases at the time of the investigation, and without treatment, 3 patients had TWIST1 values above normal, an average of 32 pg / ml.

un număr de 3 pacienți au prezentat valori TWIST1 peste normal, medie 32 pg/ml.

Discuții

În prezent se consideră EMT un proces esențial în apariția metastazelor în cursul evoluției unei tumori. Apariția de celule tumorale libere în sânge este consecința EMT totale în cazul celulelor epiteliale sau parțiale în cazul altor tipuri de celule [2]. Se consideră că în afară de ruperea legăturilor intercelulare EMT ar induce și fenotipul de celulă stem în cazul celulelor metastatice făcând ca acestea să fie rezistente la chimioterapie și la radioterapie [12]. Totodată celulele metastatice ajunse prin intermediul sângelui sau limfei în diverse zone ale organismului suportă un proces invers de tranziție mezenchimal epitelială și după traversarea endoteliului vascular se fixează în țesuturi realizând o nouă tumoră [13].

TWIST1 este un factor important în inducerea EMT având per ansamblu o acțiune puternică prometastatică și foarte posibil, implicat în proliferarea tumorală propriu-zisă [2]. Experimental s-a demonstrat că scăderea expresiei TWIST scade capacitatea de metastazare a liniilor de celule tumorale de melanom malign [14,15].

În studiul nostru investigarea TWIST1 la o tumoră cu mare potențial de metastazare, chiar în fazele primare de evoluție, a evidențiat valori serice crescute la 18 pacienți din 20 investigați. Valorile serice obținute la lotul de studiu au fost duble comparativ cu lotul martor sugerând o legătură semnificativă între valorile TWIST1 și prezența tumorii. În cazul pacienților cu adenopatie, din 8 pacienți investigați toți au prezentat valori crescute la TWIST1 de aproape trei ori mai mari decât valorile lotului martor. Prezența adenopatiei pare strâns legată de prezența valorilor crescute ale TWIST1.

Nu a existat o diferență semnificativă între pacienții cu formă nodulară de melanom și cei cu formă superficială. La ambele grupe de pacienți au existat câte un pacient cu valori normale ale TWIST1. Este de presupus că nivelul de invazie Clark și indicele Breslow, cu valori asemănătoare la ambele grupe de pacienți, prezintă o mai mare importanță în momentul examinării în comparație cu forma clinică a melanomului chiar

Discussions

Currently, EMT is considered an essential process in the emergence of metastases during tumor evolution. The appearance of free tumor cells in the blood is the consequence of a total EMT in the case of epithelial cells, or partial EMT when it comes to other cell types [2]. It is believed, that in addition to the breaking of intercellular junctions, EMT might induce stem cell phenotype in the case of metastatic cells, making them resistant to chemotherapy and radiation therapy [12]. However, metastatic cells reaching various parts of the body through blood or lymph, suffer a reverse process of mesenchymal-epithelial transition and after crossing the vascular endothelial tissue, snap into tissues making a new tumor [13].

TWIST1 is an important factor in inducing EMT with an overall strong pro-metastatic action and it is possibly involved in tumor proliferation [2]. Experimentally it was shown, that decreasing TWIST expression lowers the metastatic capacity of tumor melanoma cell lines [14,15].

In our study investigating TWIST1 in a tumor with great potential for metastasis, even in the early stages of development, showed elevated levels in 18 patients from the total of 20. The values are double compared with controls, suggesting a significant link between TWIST1 and the presence of tumor.

From the 8 patients with lymphadenopathy that we investigated, all experienced increased TWIST1 values, almost three times higher than control. Lymphadenopathy seems linked to the presence of elevated TWIST1 values.

There was no significant difference between patients with nodular melanoma and those with superficial melanoma. In both groups of patients, there was 1 patient with normal values of TWIST1.

It is assumed that Clark level of invasion and Breslow index, with similar values in both groups of patients, have a greater importance when examining the patient, compared to the clinical form of melanoma, even if it is known that the nodular form by its vertical growth presented from the beginning, has a higher capacity of metastasis.

In patients with regional lymphadenopathy, TWIST 1 values were almost two times higher

dacă se cunoaște că forma nodulară, prin creșterea verticală prezintă de la început o capacitate de metastazare mai mare. În cazul pacienților cu adenopatie regională, valorile TWIST 1 au fost aproape de două ori mai mari decât la lotul martor, la toți pacienții, sugerând că TWIST 1 are un rol important în procesul de metastazare.

O mențiune specială pentru grupa de pacienți cu tumora excizată și fără metastaze în momentul investigației, care au fost operați în urmă cu 1-2 ani. Dintre aceștia, 5 au prezentat valori serice normale ale TWIST1 iar trei dintre ei au prezentat valori serice crescute, medie 32pg/ml.

Aceste valori au fost însă mai mici decât valorile TWIST 1 obținute la pacienții purtători de tumoră din lotul propriu-zis de studiu.

Este foarte greu de precizat sursa care ar produce TWIST1, posibil o tumoră metastatică nedescoperită, posibil un nev transformat.

De asemenea este importantă semnificația acestor valori crescute care poate fi evaluată numai ținând sub observație acești pacienți o lungă perioadă de timp.

* *

*

Studiul nostru apreciază valorile serice ale TWIST1 la pacienții cu tumori prezente, tumori în care parametri clinici, histopatologici și imunhistopatologici evidențiază o posibilitate de metastazare crescută și un prognostic infaust. În acest mod valorile serice ale TWIST1 se asociază parametrilor menționați și valorii de markeri biologici ai acestora. Valoarea serică a TWIST1 la pacienții cu melanom poate constitui un marker biologic și de prognostic numai în situația urmăririi evoluției pacienților după excizia tumorii primare.

than the control group, suggesting that TWIST 1 has an important role in metastasis.

The group of patients with non-metastatic tumor, excised and free of metastasis at the time of investigation, which were operated 1-2 years ago, should be mentioned. Of these, 5 had normal TWIST1 serum levels and 3 had elevated levels, an average of 32pg / ml. However, these values were less than the values obtained in patients with an existent tumor.

It is very difficult to determine the source that would produce TWIST1 possibly, an undetected metastatic tumor, transformed nevus. Also, the meaning of these elevated values is important and can only be assessed by taking these patients under observation for a long time.

* *

*

Our study assessed serum TWIST1 values in patients with tumors, tumors in which the clinical, histopathological and immunohistochemical parameters highlight the possibility of increased metastasis and a poor prognosis. In this way, TWIST1 serum values are associated with these parameters as biological markers.

The levels of TWIST1 found in the serum of patients with melanoma might be a biological marker and a prognosis one, only in the situation where post-surgery follow-up is possible.

Bibliografie/ Bibliography

1. Kalluri R, Weinberg R.A. The basics of epithelial mesenchymal transition. *J.Clin. Invest.* 2009, 119, 1420-1424
2. Steinestel K., Edir S., Schrader A.J., Steinestel J., Clinical significance of epithelial mesenchymal transition. *Clinical and Translational Medicine*, 2014, 3, 17-21
3. Barriere G., Fili P., Gallerani G., Fabbri F., Riguard M. Epithelial Mesenchymal Transition. A Double Edged Sword. *Clinical and Translational Medicine*, 2015, 4, 14-21
4. Lamouille S., Xy J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev.Moll.Cell.Biol.* 2014, 15(3), 178-196
5. Eii Q., Huang H., Insights into role of cell-cell junctions in physiology and disease. *Rev.Cell.Mol.Biol.*, 2013, 306, 187-221
6. Yalmaz M., Christofori G., EMT the cytoskeleton and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009, 28, 15-33
7. Bastid J., Ciancia C., Puisieux A., Ansieau S., Role of Twist proteins in cancer progression. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*, 2009, 19, 1-16
8. Je E.C., Lea B.S., Ga G. The rol of transcriptional factor Twist in cancer cells . *Genetics Syndromes and Gene Therapy*, 2013, 1(1), 1-7
9. Qin Q., Xu Y., He T., Qin C., Xu J. Normal and disease related biological function of Twist and underling molecular mechanism., *Cell.Res.* 2012, 22(1), 90-106
10. Peinado H., Olmeda D., Cano A., SNAIL, ZEB and bHLH factor in tumor progression: an alliance against the epithelial phenotype. *Nature Rev. Cancer*, 2007, 7, 415-428
11. Horikawa T., Tang J., Kondo S., TWIST and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer res.* 2007, 1(67), 1970-1976
12. Mani S.A., Guo W., Liao M., Eaton N., The epithelial mesenchymal transition generate cells with properties of stem cells., *Cell*, 2008, 133, 704-715
13. Tsai J.H., Yang J., Epithelial mesenchymal plasticity in carcinoma metastatsis. *Gene and Development* 2013, 27, 2192-2206
14. Caramel J., Papadogeorgakis E., Hill L., Browine G.J., A switch in the expression of embrionic EMT inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell.* 2013, 24, 466-480
15. Weis M.B., Abel V., Mayberry M., Basile K.J., TWIST is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells. *Cancer Res.* 2012, 72, 6382-6386

Conflict de interese
NEDECLARATE

Conflict of interest
NONE DECLARED

Adresa de corespondență: alecu.mihail@gmail.com

Correspondance address: alecu.mihail@gmail.com