

Summary

Introduction

This thesis is about the treatment of solid tumors using immunotherapeutic strategies. The immune system recognizes and kills viruses, bacteria and fungi. Furthermore, it can recognize and kill cancerous cells. Unfortunately it is not always successful. Stimulating or aiding the immune system to destroy cancerous cells is called cancer immunotherapy, which is often used as an adjuvant treatment after surgery, chemotherapy or radiotherapy.

The immune system comprises various types of cells and signaling molecules. The main players covered in the thesis are T cells and dendritic cells.

The human body contains millions of slightly different T cells. Each T cell can recognize part of a protein called an epitope with its T cell receptor (TCR). The epitope is placed in a group of molecules called the MHC complex and fits perfectly in a specific TCR. When this happens, the T cell will start to divide and receives an activation signal, readying it to attack cells with the specific epitope. This will happen most efficiently when the epitope is presented by a so called antigen presenting cell. The most capable antigen presenting cell is the dendritic cell.

Not all T cells are good killers. There are several types of T cells. Roughly they can be divided in helper T cells and killer T cells (named cytotoxic T cells). Helper T cells can aid other immune cells to do their job. T cells start off as naïve cells. After they have come in contact with their antigen they develop into either effector T cells or memory T cells. Effector T cells are good at killing their targets, but have a relatively short lifespan. Memory T cells have a longer lifespan, and are responsible for immunological memory. They can be divided into central memory T cells and effector memory T cells. Many immune cells are capable of producing and interpreting chemical messengers called cytokines.

Thesis outline:

- Part one describes various immune therapeutic strategies for the treatment of head and neck cancer.
- Part two describes the use of the cytokine IL-21 in immunotherapeutic strategies.
- Part three describes the outcome of a specific type of immunotherapy for colorectal cancer patients.

Part 1 Immunotherapeutic approaches for head and neck cancer patients

The research described in Chapter 2, is the charting of T cells in the peripheral blood of head and neck cancer patients and comparing that to that healthy donors. Head and neck cancer arises from the oral cavity, larynx or pharynx. The main risk factors for developing head and neck cancer are smoking, excessive alcohol consumption and HPV infection. HPV is a group of viruses that can be divided in low risk and high risk subtypes for developing cancer. When a cell is infected with HPV, virus specific proteins are produced and expressed by the infected cell.

One of the main results of the research described in Chapter 2, is that healthy age-matched donors have more T cells than head and neck cancer patients. The percentage of effector T cells is relatively large in the group of cancer patients, while the percentage of naive T cells is small. Within the group of cancer patients we found that the percentage of effector and effector memory T cells is larger in the patients with HPV positive tumors compared to patients with HPV negative tumors.

The information obtained on the types and numbers of T cells in this patient group has the potential to be used as a prognostic tool.

Chapter 3 and 4 of this thesis describe our efforts to support the immune system in fighting head and neck cancer cells. It is possible to activate T cells of a patient with dendritic cells generated in the laboratory. Monocytes can be used to generate dendritic cells that can subsequently be loaded with antigens specific for (or associated with) tumor cells. After this, the dendritic cells can be injected back into the patient, where corresponding T cells can be activated to kill tumor cells.

Survivin is an antigen that is highly expressed in a large percentage of tumors, including head and neck cancers. Survivin plays an important role in cell mitosis and is an inhibitor of apoptosis (regulated cell death). These characteristics are important for the tumor to maintain a malignant phenotype and would therefore form a good target for immunotherapy. Dendritic cells can be loaded with mRNA encoding survivin. The dendritic cell can translate the mRNA into protein after which the protein is degraded and fragments are presented on their surface so T cells can be activated.

Before testing this setup with survivin on patients, we researched it in the lab. The first step of the investigation was to generate large numbers of survivin specific T cells from the blood of healthy donors. We were able to produce small numbers of survivin specific T cells. We did not succeed in producing large numbers of survivin specific T cells. When the percentage of survivin specific T cells increased, the T cells started to die. While generating large numbers of T cells with other specificities did not form a problem. After additional research we found that activated T cells express survivin themselves, and can therefore be recognised and killed by survivin specific T cells, a phenomenon called fratricide.

The main message of this Chapter is that survivin is not the ideal target for active immune therapy.

Another method to generate large numbers of tumor specific T cells is described in Chapter 4. T cells are made HPV specific by transducing the genetic make-up of an HPV specific T cell receptor into T cells with various specificities. HPV infections not only play an important role in the development of some head and neck cancers but also in (amongst others) cervical cancer.

To obtain the genetic code for an HPV specific T cell receptor, a T cell clone has to be generated. Dendritic cells loaded with fragments of HPV are used to stimulate T cells from healthy donors. After identifying the specific T cells, they can be sorted and cloned. From this clone the genetic material of the T cell receptor can be identified and isolated. We transduced the genetic code of the HPV specific T cell receptor from a cytotoxic T cell into helper T cells. The newly generated T cells were capable of recognising cells expressing HPV and produce the cytokine interferon gamma in response. With this method it is possible to generate large numbers of T cells that are tumor specific.

In the discussion of part 1 (Chapter 5) we reviewed various immunotherapeutic strategies for the treatment of head and neck cancer. Based on our research and that of others we can advise to focus on HPV positive tumors when developing immunotherapy for head and neck cancer patients.

Part 2 : The role of IL-21 in immunotherapy

T cells produce cytokines that effect other T cells. There are cytokines that stimulate growth, a longer lifespan or make them more effective. When developing immunotherapy we strive for the T cells to efficiently recognize and kill target cells. Furthermore, we would like them to persist sufficiently long. In our studies, described in Chapter 6 and 7, we investigated the effects of IL-21 on T cell characteristics that are favourable for anti-tumor immunity.

Normally IL-21 is produced by a subtype of helper T cells. It is, however, also possible to use synthetic IL-21. Large amounts of systemic synthetic IL-21 may lead to auto-immune disease. Therefore, local production is a safer option. In the research, described in Chapter 6, we transfected mRNA encoding IL-21 into dendritic cells, so they will start to produce IL-21. This is combined with a tumor antigen to generate tumor specific antigens. We found that dendritic cells transfected with IL-21 mRNA together with the tumor antigen mRNA, generated more tumor specific T cells than dendritic cells that were only transfected with the tumor antigen mRNA. Furthermore, when IL-21 was used, the T cells were better capable of recognizing and killing target cells.

Culturing large numbers of T cells originating from the tumor environment and injecting them back into the patient is a form of passive immunotherapy. In active immunotherapy T cells are stimulated in the patients, instead of in the lab like in passive immunotherapy. The T cells in the lab are stimulated to grow with the help of antigen presenting cells (APC), such as dendritic cells. In the investigations described in Chapter 7 we made use of APC that were artificially enhanced and are called aAPCs. The aAPC produced either no cytokine, IL-2, IL-15 or IL-21 and were used to stimulate lymphocytes originating from the tumor, called tumor infiltrating lymphocytes (TIL). We found that TIL stimulated with IL-2 producing aAPC gave rise to the most T cells. The IL-21 producing aAPC gave rise to the most cytotoxic T cells. Moreover, the T cells produced with the help of IL-21 had the highest percentage of markers on them that are typical for cells with a long lifespan. The TIL that were stimulated by IL-21 producing aAPC were also best at killing target cells.

The discussion (Chapter 8) of the second part of this thesis discusses the applicability of IL-21 in immunotherapeutic strategies. We advise not to administrate IL-21 systemically but to have it locally produced by APC.

Part 3 : Immunotherapy for Colorectal cancer patients

Active Specific Immunotherapy (ASI therapy) is a form of therapy where autologous irradiated tumor cells are injected back into the patient together with BCG. BCG or Bacillus Calmette Guérin is used to boost the immune response. ASI therapy was used two decades ago to treat colon cancer patients with stage II and III disease. The original research showed that particularly patients with small tumors benefited from this ASI therapy compared to surgery alone (the control group).

Chapter 9 describes the influence of the microsatellite status of the tumors on the effect of ASI. Today we know that about 15 % of the colon cancers are microsatellite instable (MSI). MSI tumors have more genetic alterations than microsatellite stable (MSS) tumors. Our original hypothesis was that patients with MSI tumors would benefit more from ASI therapy than patients with MSS tumors. From the performed retrospective study we learned that patients with MSI tumors already had a very good prognosis, leaving little room for improvement by ASI therapy. Patients with small MSS tumors had the most benefit from ASI therapy. They died less often from colon cancer and had less recurrences of the disease in the 15 years they were followed.

In Chapter 10 we describe our research in the same patient group that was used for the analyses the numbers of T cells and cytotoxic T cells in a colon tumor. Patients with MSI tumors had more T cell infiltration than patients with MSS tumors. Altogether patients with high T cell infiltration had a better prognosis than patients with low T cell infiltration. In addition, we investigated the effect of ASI on MSS tumors with high and low T cell infiltration. We found that patients with high T cell infiltration in the stroma of the tumor benefited the most from ASI therapy.

In the discussion (Chapter 11) of this third part the thesis our findings from Chapter 9 and 10 are analysed. We can conclude that ASI therapy has most clinical benefit for patients with MSS tumors with high T cell infiltration in the stroma.

Samenvating in het Nederlands

Inleiding

Dit proefschrift gaat over de behandeling van solide tumoren met immuuntherapie. Het immuunsysteem herkent en bestrijdt niet alleen schadelijke virussen, bacteriën en schimmels, maar kan ook abnormaal groeiend weefsel (tumoren, kanker) herkennen en opruimen. Dit lukt echter niet in alle gevallen. Je spreekt van immuuntherapie als het immuunsysteem ondersteund of gestimuleerd wordt om kankercellen te bestrijden. Bij de behandeling van kanker kan immuuntherapie in aanvulling op chirurgie, chemotherapie of bestraling worden ingezet.

Het immuunsysteem wordt gevormd door een complex samenspel van verschillende typen cellen en chemische signalen. De belangrijkste spelers van het immuunsysteem in dit proefschrift zijn T cellen en dendritische cellen.

Een menselijk lichaam bevat miljoenen subtiel verschillende T cellen. Een bepaald type T cel kan een specifiek eiwitfragment (antigen) – zoals een onderdeel van een virus of een kankercel – herkennen. Een T cel herkent een antigen met behulp van een receptor, de T cel receptor (TCR). Als een T cel zijn antigen herkent, kan het de cel met het antigen direct aanvallen en vernietigen. De dendritische cel (DC) kan antigenen opnemen en in delen aan een T cel ‘laten zien’ (presenteren). Deze kan daardoor worden geactiveerd, aangezet worden tot vermenigvuldigen om vervolgens tumorweefsel aan te vallen met het antigen dat oorspronkelijk door de DC werd gepresenteerd.

Er zijn verschillende typen T cel. Het type dat aanvalt is de cytotoxische T cel. Belangrijk is ook de helper T cel. Deze kan andere celtypen en ook andere T cellen ‘aansporen’ tot grotere activiteit. Voor beide typen T cellen geldt dat ze in eerste instantie naïeve cellen zijn. Deze zijn nog niet in aanraking gekomen met een passend antigen. Zodra dat wel is gebeurd, raken ze ‘geactiveerd’ en vermenigvuldigen ze zich. Daarbij ontstaan twee typen: effector T cellen en memory T cellen. De effector T cellen hebben een korte levensduur, bedoeld voor de acute dreiging. Memory T cellen leven lang en zijn bedoeld voor dreigingen in de toekomst. Er zijn ook weer twee typen memory T cellen: effector memory T cellen en centrale memory T cellen. De diverse typen cellen van het immuunsysteem gebruiken cytokinen – chemische boodschappers – om met elkaar te ‘communiceren’.

Dit proefschrift bestaat uit de volgende delen:

- Deel 1 behandelt immuuntherapie voor de behandeling van hoofdhalsskanker.
- Deel 2 behandelt de rol van het cytokine IL-21 in immuuntherapie.
- Deel 3 behandelt een vorm van immuuntherapie bij de behandeling van kankers van de dikke darm.

Deel 1 immunotherapie voor de behandeling van hoofdhalsskanker

Het onderzoek beschreven in hoofdstuk 2, heeft een nadere analyse van het type T cel in relatie tot het type kanker opgeleverd. Daartoe werden witte bloedcellen uit het bloed van een groep hoofdhalsskanker patiënten onderzocht.

Hoofdhalsskanker kan ontstaan in de mondholte, de larynx (strottehoofd), of de pharynx (keelholte). De belangrijkste risicofactoren bij het krijgen van hoofdhalsskanker zijn roken, drinken en HPV infecties. HPV vormt een groep virussen met uiteenlopende effecten bij infectie. Bij infecties met dit virus kunnen HPV positieve tumoren - dat wil zeggen tumoren die eiwitten van het HPV virus bij zich dragen - ontstaan, vooral uit de pharynx. HPV bestaat uit veel verschillende subtypen waarvan velen waarschijnlijk geen verhoogd risico op kanker geven, maar enkele wel, de zogeheten hoogrisico HPV subtypes.

Een van de belangrijkste resultaten van het onderzoek uit hoofdstuk 2 is dat hoofdhalsskanker patiënten minder T cellen hebben dan gezonde mensen van dezelfde leeftijd. Het aantal effector T cellen is in de patiëntengroep echter relatief groter, terwijl het aantal naïeve T cellen bij hen kleiner is. Binnen de groep van hoofdhalsskanker patiënten bleken de patiënten met HPV positieve tumoren meer effector en effector memory T cellen te hebben dan patiënten met HPV negatieve tumoren. De gegevens over de aantallen en de verdeling van typen T cellen zouden kunnen worden gebruikt om gemakkelijk informatie in te winnen over het te verwachten ziekteverloop bij hoofdhalsskanker patiënten. Dit is echter nu nog niet te zeggen. Over enkele jaren kan er worden uitgezocht of de verkregen informatie over de verschillende T cellen in het bloed van deze patiënten een voorspellende waarde hebben met betrekking tot de 5-jaars overleving.

Hoofdstuk 3 en 4 van dit proefschrift behandelen onderzoek naar mogelijkheden om het immuunsysteem te helpen bij het bestrijden van tumorcellen. Het is mogelijk T cellen te activeren door geschikte dendritische cellen in het laboratorium te maken en deze aan een patiënt toe te dienen. De dendritische cellen worden gemaakt met behulp van monocytten (net als dendritische cellen en T cellen een onderdeel van het immuunsysteem) die gewonnen worden uit het bloed van patiënten of gezonde donoren. De dendritische cellen worden voorzien van antigenen die geassocieerd zijn met de te behandelen tumoren, waardoor tumor specifieke T cellen van de patiënt worden geactiveerd.

Survivin is een antigen dat bij een hoog percentage tumoren waaronder hoofdhalsskanker tumoren in hoge mate wordt geproduceerd en gepresenteerd. Survivin is betrokken bij de celdeling en kan gereguleerde celdood (apoptose) remmen. Apoptose is nodig om weefsel niet ongeremd te laten groeien. In het laboratorium kunnen we dendritische cellen eiwit fragmenten van survivin laten presenteren door het mRNA van survivin in dendritische cellen plaatsen. Het mRNA wordt vervolgens door de dendritische cellen zelf vertaald naar eiwit om daarna te worden gepresenteerd waarmee T cellen kunnen worden gestimuleerd.

Voordat deze techniek op patiënten kan worden getest, is er laboratoriumonderzoek gedaan. Het eerste doel van het laboratoriumonderzoek was het genereren van grote aantallen survivin specifieke T cellen met behulp van het bloed van gezonde donoren. Het bleek mogelijk om kleine aantallen te maken, grote aantallen lukte echter niet: de T cellen gingen dood. De gebruikte technieken voor het maken van grote aantallen waren eerder – bij T cellen met andere specificiteiten – wel succesvol.

Uit nader onderzoek bleek dat geactiveerde T cellen survivin tot expressie brengen en

hier fragmenten van presenteren, waardoor ze een prooi zijn voor survivin specifieke T cellen. Er treedt dus broedermoord op.

De belangrijkste conclusie uit hoofdstuk 3 is dat survivin geen geschikte kandidaat is als antigen voor actieve immunotherapie.

Er zijn ook andere methoden om grote hoeveelheden tumor specifieke T cellen te genereren. In hoofdstuk 4 wordt een methode beschreven waarmee T cellen HPV specifiek worden gemaakt door middel van het overbrengen naar de T cel van genetisch materiaal dat de juiste T cel receptor codeert. HPV infecties dragen niet alleen bij aan het ontstaan van bepaalde typen hoofdhalsskanker maar ook bij bijvoorbeeld baarmoederhalsskanker.

Om de genetische code van een specifieke T cel te verkrijgen moet er eerst een kloon worden gegenereerd in het lab. Dit gebeurt door middel van het stimuleren van T cellen met dendritische cellen die het antigen presenteren waarin we zijn geïnteresseerd. Als deze zijn geïdentificeerd, worden de cellen gesorteerd en verder opgekweekt. Er volgt een proces waarbij de specifieke code moet worden gevonden, geïsoleerd en gecontroleerd. In dit geval is de genetische code van de TCR van een cytotoxische T cel gebruikt in helper T cellen. De T cellen met de nieuwe T cel receptoren bleken in staat om HPV specifiek eiwit te herkennen en als reactie het cytokine interferon gamma te produceren. Interferon gamma activeert bepaalde delen van het immuunsysteem. Het onderzoek heeft aangetoond dat T cellen kunnen worden ‘omgebouwd’ om zo tumor specifieke T cellen te genereren.

De discussie (hoofdstuk 5) van dit eerste deel bestaat uit een review waarin verschillende immunotherapeutische strategieën om hoofdhalsskanker tumoren te behandelen worden besproken. Op basis van onze studies en gegevens uit de literatuur kan aangeraden worden om in eerste instantie strategieën te ontwikkelen voor patiënten met HPV positieve tumoren.

Deel 2 IL-21 in immunotherapie

T cellen produceren cytokines waar deze en andere T cellen op reageren. Zo zijn er cytokines die groei stimuleren, cytokines waardoor T cellen langer blijven leven en cytokines die T cellen effectiever maken bij hun opruimwerk. Bij het ontwikkelen van immunotherapeutische strategieën wordt er gekeken naar de eigenschappen van de T cellen die de tumor aanvallen. Ten eerste willen we dat de T cel de tumorcellen kan herkennen. Verder willen we dat het er veel zijn, dat ze goed tumorcellen kunnen doden en persisteren. In onze studies, beschreven in hoofdstuk 6 en 7, zijn de mogelijkheden onderzocht om het cytokine IL-21 in te zetten als versterker van de activiteit van tumorspecifieke T cellen.

Normaal wordt IL-21 geproduceerd door een type helper T cellen, maar het is ook mogelijk om gesynthetiseerde IL-21 direct aan T cellen toe te voegen. Teveel IL-21 zou echter kunnen leiden tot auto-immuun ziekten. Lokale productie (in de patiënt) van het cytokine is daarom wenselijk. In dit onderzoek is gekozen voor de productie van IL-21 door DCs (dendritische cellen). Het is mogelijk om dendritische cellen een specifiek antigeen te laten presenteren door mRNA in de dendritische cel aan te brengen. Het is met dezelfde techniek ook mogelijk om de dendritische cel behalve het antigeen ook IL-21 te laten maken. In het onderzoek beschreven in hoofdstuk 6, zijn de effecten van dendritische cellen met IL-21 en zonder IL-21 op de productie van specifieke T cellen met elkaar vergeleken. De IL-21 toevoeging aan de dendritische cellen zorgt ervoor dat er meer specifieke T cellen

werden aangemaakt. Bovendien waren deze T cellen beter in staat om cellen te doden.

Een vorm van passieve immunotherapie is het kweken van T cellen afkomstig uit de tumor buiten het lichaam om deze vervolgens in grotere aantallen in de patiënt terug te spuiten. Je spreekt van actieve immunotherapie wanneer het aanmaken van T cellen in de patiënt zelf wordt gestimuleerd. Bij passieve immunotherapie kunnen T cellen in het laboratorium worden gestimuleerd door Antigen Presenterende Cellen, zogenaamde APC's. Een dendritische cel is een voorbeeld van een APC. In hoofdstuk 7 wordt beschreven hoe genetisch gemanipuleerde antigen presenterende cellen (aAPC's) T cellen kunnen stimuleren. Tumor infiltrerende lymfocyten zijn witte bloedcellen die in tumoren binnendringen. Door TILs in het laboratorium met aAPC's te stimuleren kunnen er grote hoeveelheden T cellen worden gekweekt. Het onderzoek (hoofdstuk 7) liet zien dat wanneer aAPC's die het cytokine IL-2 produceren, worden gebruikt voor het stimuleren van de tumor infiltrerende lymphocyten er de meeste T cellen ontstaan. Het aantal cytotoxische cellen was echter ten opzichte van de ontstane helper T cellen laag. aAPC's met IL-21 leidden wel tot relatief veel cytotoxische T cellen die bovendien het beste in staat bleken de juiste tumorcellen te doden en tevens hebben ze eigenschappen van T cellen met een lange levensduur.

Dit tweede deel van het proefschrift wordt afgerond met een discussie (hoofdstuk 8) over de toepasbaarheid van IL-21 bij immunotherapeutische strategieën. Op basis van het uitgevoerde onderzoek en gegevens uit de literatuur raden wij aan om IL-21 niet systemisch in de patiënt toe te passen, maar lokaal te laten produceren.

Deel 3 immunotherapie bij dikkedarmkankers

Actieve specifieke immunotherapie (ASI) bestaat uit het terug spuiten van bestraalde tumorcellen in combinatie met het BCG vaccin. Dit vaccin is in de eind jaren tachtig en begin jaren negentig toegepast op een groep stadium II en III darmkanker patiënten (er worden vier kankerstadia onderscheiden). Het bleek dat vooral stadium II darmkanker patiënten minder last hadden van het terugkeren van de tumor na operatieve verwijdering plus ASI therapie vergeleken met patiënten die enkel chirurgie hadden ontvangen (controle groep).

Hoofdstuk 9 beschrijft het onderzoek naar de invloed van de microsatelliet status van de tumoren op het effect van ASI therapie. Tegenwoordig is bekend dat ongeveer 15% van de darmkanker tumoren microsatelliet instabiel (MSI) zijn. MSI zorgt voor vele genetische veranderingen in de genetische opmaak van de tumorcellen, meer dan bij microsatelliet stabiele (MSS) tumoren. Onze oorspronkelijke hypothese was dat deze groep patiënten wel eens het meest baat kon hebben bij ASI therapie. Uit het uitgevoerde retrospectief onderzoek bleek echter dat de overleving van deze groep patiënten al zodanig hoog was dat er geen ruimte voor verbetering overbleef door ASI therapie. Het bleken vooral de kleinere MSS tumoren te zijn waar ASI therapie het meeste effect op had. Wanneer deze patiënten ASI therapie ontvingen, gingen er minder van hen aan de ziekte dood en hadden er ook minder van hen last van het terugkeren van de tumor in de 15 jaar dat zij gevolgd zijn.

In hoofdstuk 10 wordt beschreven hoe in deze zelfde patiëntengroep een analyse is gemaakt van het aantal T cellen en CD8 positieve T cellen. Het bleek dat patiënten met MSI tumoren meer tumor infiltrerende T cellen hebben dan patiënten met MSS tumoren. Tevens is de algehele overleving onderzocht van patiënten met hoge T cel infiltraten vergeleken

met patiënten met lage T cel infiltraten. Patiënten met hoge infiltraten hebben een betere overleving en minder kans op recidieven. Vervolgens is onderzocht of ASI therapie meer effect heeft op patiënten die veel T cellen in hun tumor hadden of op patiënten met weinig T cellen in hun tumor. Er is alleen naar patiënten met MSS tumoren gekeken. Resultaat: patiënten met hoge T cel infiltraten in het stroma (steunweefsel) van de tumor hebben baat bij ASI therapie.

Het derde en laatste deel van het proefschrift wordt afgerond met een discussie (hoofdstuk 11). Op basis de retrospectieve studies beschreven in hoofdstuk 9 en 10 kan een betere inschatting worden gemaakt over welke patiëntengroep baat heeft bij ASI therapie.

Curriculum Vitae

Annelies Turksma was born on May 6th, 1981, in Nijmegen, the Netherlands. She graduated from high school (VWO) in 1999 at Laar & Berg in Laren. After having worked for a year, she started her study Biomedical Sciences at the Vrije Universiteit (VU) in Amsterdam in 2000. She obtained a bachelor degree in 2004, and in that same year started her master study in Oncology, also at the VU. During this master study, Annelies did three internships. In 2004 she did her first internship at the VU Medical Center (VUmc), Amsterdam at Department of Medical Oncology. The subject was thymidine phosphorylase and uridine phosphorylase in (fluoro)pyrimidine metabolism. Her second internship started in 2005, at the Department of Otolaryngology of the VUmc and had as subject genetic factors in head and neck cancer. For her third and final internship she worked on ERCC1 and UV sensitivity in keratinocytes, at the University of Edinburgh, in Edinburgh. Annelies obtained her Masters of Science in Oncology at the VUmc in 2007, and in that same year she started as a graduate student, also at the VUmc under supervision of Prof. Dr. C.J.L.M. Meijer, Prof. Dr. C.R. Leemans, Dr. E. Hooijberg and Prof. Dr. E. Bloemena. The results of her research are presented in this thesis entitled: Preclinical studies on immunotherapeutic approaches for the treatment of solid tumors.

Publication list

- Turksma AW, Shamier MC, Lam K, de Weger V, Euler Z, Belien JA, Meijer GA, E. Bloemena, CJLM Meijer, Hooijberg E Extent and location of tumor infiltrating lymphocytes in micro-satellite stable colorectal cancer predicts outcome to adjuvant Active Specific Immunotherapy (under review at clinical cancer research)
- Turksma AW, Bontkes HJ, Ruizendaal JJ, Moesbergen L, de Gruijl TD, Leemans CR, Bloemena E, Meijer CJLM, Hooijberg E. *J Transl Med.* 2013 Jun 20;11:152 Survivin, the ideal target for immunotherapeutic strategies in HNSCC patients
- Santegoets SJAM, Turksma AW, Powell Jr. DJ, Hooijberg E, de Gruijl TD *Oncoimmunology.* 2013 Jun 1; 2(6):e24522 IL-21 in cancer immunotherapy: at the right place at the right time
- Turksma AW, Bontkes H, Ruizendaal JJ, van den Heuvel H, Scholten KBJ, Santegoets SJAM, de Gruijl TD, Bloemena E, Meijer CJLM, Hooijberg E *Hum Immunol.* 2013 May; 74(5):506-13 Electroporated IL21 mRNA in moDCs increases cytotoxic capacity of TAA specific T cells
- Santegoets SJAM, Turksma AW, Suhoski MM, Stam AGM, van den Eertwegh AJM, Carroll RG, Powell Jr. DJ, Albelda SM, Scheper RJ, Gerritsen WR, de Gruijl TD, June CH *J Transl Med.* 2013 Feb 12;11:37 IL-21 promotes the expansion of tumor infiltrating lymphocytes with high cytotoxic potential and low Treg numbers
- Turksma AW, Braakhuis B, Bloemena E, Leemans CR, Hooijberg E *Immunotherapy.* 2013 Jan;5(1):49-61 Immunotherapy in HNSCC patients, shifting the balance. Review
- Turksma AW, Bontkes HJ, van den Heuvel H, de Gruijl TD, von Blumberg BME, Braakhuis BJM, Leemans CR, Bloemena E, Meijer CJLM, Hooijberg E *Oral Dis.* 2012 Oct 24. Circulating effector (memory) T cell frequencies in relation to tumor stage, location and HPV status in HNSCC patients
- de Weger VA*, Turksma AW*, Voorham QJ*, Euler Z*, Bril H, van den Eertwegh AJ, Bloemena E, Pinedo HM, Vermorken JB, Van Tinteren H, Meijer GA, Hooijberg E. *Clin Cancer Res.* 2011 Dec 12 Clinical effects of Adjuvant Active Specific Immunotherapy differ between Patients with Microsatellite Stable and Microsatellite Instable Colon Cancer (* these authors contributed equally)
- Scholten KB, Turksma AW, Ruizendaal JJ, van den Hende M, van der Burg SH, Heemskerk MH, Meijer CJ, Hooijberg E. *J Transl Med.* 2011 Sep 5;9:147. Generating HPV specific T helper cells for the treatment of HPV induced malignancies using TCR gene transfer
- Temmink OH, de Bruin M, Turksma AW, Cricca S, Laan AC, Peters GJ. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(3):565-75. Epub 2006 Oct 21. Activity and substrate specificity of pyrimidine phosphorylases and their role in fluoropyrimidine sensitivity in colon cancer cell lines
- Temmink OH, de Bruin M, Laan AC, Turksma AW, Cricca S, Masterson AJ, Noordhuis P, Peters GJ. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1759-65. Epub 2006 May 9. The role of thymidine phosphorylase and uridine phosphorylase in (fluoro)pyrimidine metabolism in peripheral blood mononuclear cells.

Dankwoord

Tja, het dankwoord. Het gedeelte dat iedereen daadwerkelijk leest. Het deel dat de meeste mensen het leukst vinden om te schrijven. Ik ben veel mensen heel dankbaar, toch vind ik het lastig mijn dank onder woorden te brengen. Ik ben bang mensen te vergeten. In de afgelopen zes jaar zijn er veel mensen geweest die iets voor me hebben betekend. Hier mijn poging tot een gebalanceerd dankwoord.

De commissie

Bedankt Chris, voornamelijk bij de begeleiding van die laatste loodjes. En een advies wat ik mij ter harte heb genomen: *als je iets wilt, moet je blijven pushen*. Bedankt René, voor het introduceren van de klinische kant van het onderzoek. Een goede samenwerking tussen lab en kliniek is zeer belangrijk. Bedankt Erik, voor je opmerkingen, adviezen en sturing. Ondertussen kan ik zelfs je handschrift lezen. Het waren pittige tijden, maar gelukkig hadden we altijd de borrels nog: op het CCA, kleine kroegjes in Friesland en foute tenten op de Zuidas. Bedankt Elisabeth, je vertrouwen en positieve sturing in de zwaardere tijden hebben mij zeker geholpen.

De leescommissie

De zes personen die de zware taak op zich hebben genomen dit proefschrift van voor tot achter te lezen. Bedankt Tanja de Gruijl, Rik Scheper, Marieke van Ham, John Haanen, Sjoerd van den Burg en Jolanda de Vries.

De Hooijberggroep

Ten eerste de werkbesprekingen; ik heb er tegenop gezien en ik heb er naar uitgekeken. Janneke bedankt voor het delen van je labwijsheden, je luisterend oor tijdens het kweken, je positiviteit en je adviezen. Kirsten, samen hebben we veel meegemaakt, heel stoer dat je Zwitserland leert hoe je TCRs transduceert. Heleen, ik ben blij dat ik je destijds heb kunnen overhalen om bij ons te komen werken. Verder wil ik alle studenten die zich in de loop der jaren hebben ingezet, bedanken: Linda, Johanneke, Shakila, Vincent, Marc en Kevin bedankt! Dankzij jullie harde werken is dit boekje tot stand gekomen.

Tanja en Hetty

Ik ben jullie beiden zeer dankbaar voor alle adviezen en steun. Jullie hulp heeft gevarieerd van tips over experimenten tot lange wijndrinksessies. Dat ik me mocht aansluiten bij de werkbespreking van Tanja heeft me ook enorm geholpen. Ik hoop vooral dat we de gezellige avondjes kunnen voortzetten.

Mede AIO's

Het was top! Er is niets beter dan een spontane borrel als je het nodig hebt. Na dit wijntje ga ik echt naar huis... Bedankt allemaal voor de gezelligheid, etentjes, het pathologie AIO weekend, de koffiebreaaks, de niet te vermijden borrels en zelfs het bowlen. Bedankt oud kamergenootjes: Saskia S, Saskia C, Rienke, Jelle, Maria, Hester, Hedy, Berbel, Inge, Kirsten, Suki, Famke, Jolanda, Freddie, McMaar, Notoya, Eveline, Laura, Marijn, Rennie, Lotte, Bas, Rubina, Tamara, Joyce, Shenay, en Marjolein. Karin, misschien is het maar goed dat we nooit samen op een kamer hebben gezeten, dat was te gezellig geweest.

Het lab

Verder heb ik ook altijd veel plezier gehad met iedereen van het lab. Ik ben iedereen dankbaar voor zijn of haar hulp met experimenten, over en weer leenacties, bitchkwartiertjes en meezingmomentjes. Bedankt Dinja (2.13 catwalkshows!), Anita (hoe laat gaan we naar huis?), Sinead, Basav, Laura, Nathalie, en alle anderen van het MLII gebied en elfo lab!

Sas²

Als jullie me niet al die keren moed in hadden gepraat was er nooit een boekje gekomen, ontzettend bedankt!

Medische immunologie

Bedankt iedereen van de afdeling medische immunologie. In het bijzonder Marco, Mary, Hetty, Martine en iedereen die ik op het eind van de dag nog opzadelde met hele kleine samples waar ik heel veel info uit wilde.

Afdeling KNO

Bedankt voor de samenwerking, zowel op het lab als in de kliniek. Menig donderdag heb ik rondgehangen op de poli op zoek naar geschikte patiënten. Arjan, Michiel en Marijke bedankt voor het meer dan honderd keer oppiepen voor bloedsamples. Boudewijn bedankt voor je belangrijke bijdragen aan de HNSCC hoofdstukken uit mijn proefschrift.

Afdeling pathologie

Bedankt voor zes boeiende jaren. Ik heb genoten van de schaatsuitjes en andere activiteiten. Alle zeilgenootjes bedankt, van wat ik me ervan kan herinneren was het super. Onder andere met het duo Pim en Niek (van Pim en Niek), de passagiers van de relaxboot (jullie weten wie jullie zijn) en alle anderen!

Co-auteurs

Zeer veel dank ben ik schuldig aan al mijn coauteurs. Ik besef me dat er zeer veel van jullie tijd heeft gezeten in de papers die dit proefschrift dragen.

Vrienden

Annemieke, Anne Marie en vele anderen bedankt voor de borrels, oppep-acties en gezelligheid.

Paranimfen

Famke en Sue, ik ben heel blij dat jullie mijn paranimfen willen zijn. Met z'n drieën hebben we massa's leuke momenten gehad, maar ook heel wat hindernissen genomen. Ik kan me geen betere paranimfen bedenken. Bedankt en succes met jullie boekjes en opleidingen!

Familie

Siebe en Leida, bij niemand is het minder waar dan bij jullie: bedankt, zonder jullie was dit boekje er nooit gekomen! En natuurlijk de rest van de familie bedankt: Katrijn, Herman en Eva, Rink en Thomas.

Jeroen

En natuurlijk Jeroen. Het heeft wat langer geduurd dan verwacht, het is wat heftiger geweest dan ik kon voorspellen, maar nu is het klaar. Dank je wel voor je steun en talloze manieren om me te helpen. Je bent me eten komen brengen op de VU als het weer eens laat werd, ging in het weekend mee voor de gezelligheid en schonk een wijntje in na een lange werkdag. Ik ben benieuwd wat de toekomst ons brengt!

