



Chapter 9
Samenvatting in het Nederlands.

Plaveiselcelcarcinomen in het hoofd-halsgebied (HHPCC) ontstaan in de slijmvliezen van de mond- en keelholte. Deze worden vaak pas ontdekt in een laat stadium van de ziekte, d.w.z. wanneer de tumor groter is dan 4 cm en/of zich heeft verspreid naar één of meerdere lymfeklieren in de hals. Voor patiënten met een tumor in een vergevorderd stadium wordt altijd een combinatie van chirurgie, bestraling en chemotherapie toegepast. Dit zijn intensieve behandelingen met consequenties voor de kwaliteit van leven. Ondanks voortschrijdende inzichten in therapiemogelijkheden, is de 5-jaars overleving van HHPCC al jaren slechts rond de 50%^(1,2).

Om de kans op overleving van HHPCC te vergroten en de neveneffecten van de behandeling te minimaliseren, is er duidelijk behoefte aan verbetering van gebruikelijke therapieën of het toepassen van nieuwe therapieën. Dit kan door additionele behandelingen te ontwikkelen die de tumor (opnieuw) gevoelig maken voor chemotherapie of bestraling. Een andere mogelijkheid is dat er nieuwe therapieën worden ontwikkeld die gericht zijn tegen eiwitten die specifiek van belang zijn voor de viabiliteit van tumorcellen, en niet voor gezonde cellen. In dit proefschrift wordt getracht dergelijke eiwitten te identificeren door mRNA niveaus in HHPCC cellen te verlagen en door specifieke subpopulaties van cellen uit HHPCCs te isoleren en te karakteriseren. Daarnaast wordt het mechanisme van cisplatinum-resistentie onderzocht om beter te kunnen begrijpen welke processen essentieel zijn voor de ongevoeligheid voor de therapie.

Er is een overweldigende hoeveelheid data beschikbaar over hoe behandeling met cisplatinum kan leiden tot celdood^(3,4). Echter, het is nog geheel onduidelijk waarom sommige tumorcellen resistent zijn tegen cisplatinum. Ook voor HHPCC zijn er geen publicaties te vinden met eenduidige verklaringen voor cisplatinum-resistentie. In **Hoofdstuk 2** hebben we in 19 verschillende HHPCC cellijnen gekeken naar de mate van expressie van een aantal genen die een rol lijkt te spelen in cisplatinum activiteit. Daarnaast hebben we in deze cellijnen de accumulatie en retentie van cisplatinum in een bepaalde tijdsperiode bepaald, alsmede hoeveel platinum-DNA adducten er ontstaan. De enige factor die significant correleerde met cisplatinum-sensitiviteit was de hoeveelheid platinum-DNA adducten ($p=0.006$, Spearman's rank correlation coefficient). Het blijkt dat de hoeveelheid platinum adducten in het DNA een belangrijke factor is bij het verklaren van de gevoeligheid voor het chemotherapeutikum.

In de bovengenoemde inventarisatie hebben we gericht gekeken naar een kleine selectie van genen en cellulaire processen die volgens de literatuur betrokken zijn bij de respons op cisplatinum. Hiervoor zijn we afhankelijk geweest van welke gegevens er gepubliceerd zijn en in welke tumormodellen het onderzoek is uitgevoerd. Het is goed mogelijk dat de resistentiemechanismen per tumortype verschillen. Om deze reden hebben we in **Hoofdstuk 3** gebruik gemaakt van een functionele siRNA screen om in een HHPCC cellijn alle genen in het humane genoom te analyseren. Hierbij hebben we specifiek gezocht naar alle genen die van invloed zijn op de cisplatinum-respons. In de toplist met genen die verantwoordelijk kunnen zijn voor cisplatinum-resistentie hebben we een aantal genen gevonden uit het Fanconi-BRCA signaalpad welke betrokken is bij het herstellen van DNA crosslinks. Dit geeft opnieuw aan dat de DNA adducten, die door cisplatinum worden gevormd, een grote invloed hebben op de cisplatinum-gevoeligheid van een cel. Immers, DNA schade die niet wordt hersteld, zal uiteindelijk veelal leiden tot celdood. Daarnaast vonden we dat *SHFM1*, een gen dat gemuteerd is in het "split-hand/split-foot malformation" syndroom⁽⁵⁾, een belangrijke rol heeft in de gevoeligheid voor cisplatinum, waarschijnlijk door het stabiliseren van BRCA2. Beide genen lijken cruciaal voor het herstellen van door cisplatinum-geïnduceerde DNA schade.

Naast de genen die betrokken zijn bij de respons op cisplatinumbehandeling, resulteerde de siRNA screen ook in een lijst met genen die blijkbaar essentieel zijn voor het voortbestaan van de tumorcel. Verlaagde expressie van elk van deze genen had celdood tot gevolg, zelfs zonder toevoeging van cisplatinum. Dergelijke genen zijn veelbelovende kandidaten om te dienen als aangrijpingspunt voor nieuwe therapieën. In **Hoofdstuk 4** wordt de clusteranalyse beschreven die laat zien dat een deel van de geïdentificeerde tumor-essentiële genen betrokken is bij de

regulatie van de G2/M fase van de celcyclus. In daaropvolgende experimenten kon in meerdere cellijnen worden bevestigd dat expressie van deze genen inderdaad noodzakelijk is om een tumorcel in leven te houden. Vervolgens hebben we ons gericht op *KIF11*, een gen met een belangrijke rol in het correct opzetten van de mitotische spindle⁽⁶⁾. Door gebruik te maken van ispinosib, een krachtige synthetische remmer van de functie van *KIF11*⁽⁷⁾, hebben we *in vivo* kunnen laten zien dat functioneel *KIF11* zeer belangrijk is voor de groei van HHPCC xenograft tumoren. Hiermee hebben we bewezen dat de hitlijst verkregen met de siRNA screen bruikbaar is om doelwitten voor nieuwe therapieën te vinden.

Tot nu toe hebben we gebruik gemaakt van siRNAs, die de expressie van één enkel gen kunnen beïnvloeden. In de literatuur is echter beschreven dat het verlies van expressie van één gen gecompenseerd kan worden door een verandering in expressie van andere genen^(8,9). Het is goed mogelijk dat een bepaald fenotype duidelijker wordt wanneer meerdere genen tegelijkertijd worden geremd, bijvoorbeeld door het gebruik van microRNAs⁽¹⁰⁾. In **Hoofdstuk 5** hebben we onderzocht wat het effect van overexpressie van microRNAs is op de viabiliteit van een HHPCC cellijn. Tevens zijn dezelfde microRNAs tot overexpressie gebracht in conditioneel geïmmortaliseerde orofaryngeale keratinocyten (ciOKCs), een soort pseudo-normale slijmvliescellen. In deze cellen is eveneens de overleving bepaald. Door de resultaten die verkregen zijn in de verschillende celmodellen te vergelijken, vonden we zes microRNAs die de proliferatie van tumorcellen verminderden, terwijl ciOKCs normaal konden doorgroeien. De genen die gereguleerd worden door deze zes microRNAs zijn potentiële doelwitten voor nieuwe therapieën. Microarray resultaten hebben laten zien dat een aantal van de gevonden microRNAs invloed heeft op de expressie van *ATM*. Hieruit blijkt dat *ATM* belangrijk is voor de viabiliteit van HHPCC cellen.

Een decennium geleden is de hypothese ontwikkeld dat binnen een tumor een kleine celpopulatie bestaat, welke er voor zorgt dat de tumor blijft groeien. Tevens worden deze cellen verantwoordelijk gehouden voor het ontstaan van uitzaaiingen en resistentie tegen therapie⁽¹¹⁾. Het uitroeien van deze populatie tumorcellen, ook wel kankerstemcellen (CSC) genoemd, zou mogelijk kunnen leiden tot het volledig elimineren van een tumor. Hiervoor is genetische karakterisering van de CSC populatie noodzakelijk. Recent is CD44 geïdentificeerd als CSC marker voor HHPCC⁽¹²⁾. Echter, deze marker komt niet specifiek tot expressie op cellen in de basale laag van het normale epitheel en de goed-gedifferentieerde tumoren, de plaats waar wij nu juist stemcellen verwachten. Daarnaast is de marker niet stabiel wanneer de cellen worden behandeld met enzymen die gebruikt worden om de cellen uit weefsel te isoleren. In **Hoofdstuk 6** beschrijven we hoe wij CD98 identificeren als een meer specifieke en gebruiksvriendelijkere marker om CSCs te isoleren. Tumoren die gekweekt zijn in muizen bevatten CD98^{hoog} en CD98^{laag} cellen. Deze populaties konden apart geïsoleerd en teruggespoten worden in immuundeficiënte muizen. De CD98^{hoog} cellen veroorzaakten in 60% van de injecties een nieuwe tumor, terwijl CD98^{laag} cellen nooit uitgroeiden tot een nieuwe tumor. Microarray analyse van de CD98^{hoog} cellen liet zien dat deze cellen een verhoogde expressie hebben van genen die betrokken zijn bij de regulatie van de celcyclus en bij het behoud van de DNA-integriteit.

Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat HPV-positieve HHPCCs een betere prognose hebben dan HPV-negatieve tumoren⁽¹³⁾. De reden voor dit verschil is nog niet volledig duidelijk. Een mogelijke verklaring is dat de HPV-positieve tumoren beter reageren op de bestaande behandelingen en dat dit wellicht samenhangt met het aantal CSCs in deze tumoren. Door middel van immunohistochemische kleuringen voor CD44 en CD98 hebben we in **Hoofdstuk 7** biopten van 711 orofaryngeale tumoren (OPCCs) onderzocht op het aantal aanwezige CSC-achtige cellen. Van alle OPCCs is tevens de HPV-status bepaald. Uit het grote aantal tumoren met een hoog percentage cellen dat positief kleurde voor CD44, hebben we wederom geconcludeerd dat CD44 niet een heel bruikbare marker is voor HHPCC CSCs. Niettemin was het percentage van zowel CD44-positieve als CD98-positieve cellen significant lager in HPV-positieve tumoren in vergelijking met HPV-negatieve tumoren ($p < 0.001$, voor beide markers, Pearson χ^2 -test). Dit

suggereert dat het relatief hogere aantal CSCs de slechtere klinische vooruitzichten van HPV-negatieve tumoren mede zou kunnen verklaren. In de patiëntengroep met een HPV-positieve OPCC hadden de tumoren met een hogere expressie van CD98 een significant slechtere 5-jaarsoverleving, alsmede een slechtere progressie-vrije overleving ($p=0.006$ en $p<0.001$, respectievelijk). Deze data suggereren dat het aantal CSCs inderdaad van invloed is op de respons op behandeling, maar merkwaardig genoeg alleen in de HPV-positieve tumoren. In HPV-negatieve tumoren zijn de moleculaire karakteristieken van de CSCs vermoedelijk belangrijker.

REFERENCES

1. Akervall J, Guo X, Qian CN *et al.* Genetic and expression profiles of squamous cell carcinoma of the head and neck correlate with cisplatin sensitivity and resistance in cell lines and patients. *Clin. Cancer Res.* 2004;10:8204-8213.
2. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C *et al.* Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. *Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. Lancet* 2000;355:949-955.
3. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2007;7:573-584.
4. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265-7279.
5. Crackower MA, Scherer SW, Rommens JM *et al.* Characterization of the split hand/split foot malformation locus SHFM1 at 7q21.3-q22.1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development. *Hum. Mol. Genet.* 1996;5:571-579.
6. Blangy A, Lane HA, d'Herin P *et al.* Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 1995;83:1159-1169.
7. Lad L, Luo L, Carson JD *et al.* Mechanism of inhibition of human KSP by ispinesib. *Biochemistry* 2008;47:3576-3585.
8. Degtyarev M, De MA, Orr C *et al.* Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *J Cell Biol.* 2008;183:101-116.
9. Gill C, Dowling C, O'Neill AJ *et al.* Effects of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation. *Mol. Cancer* 2009;8:39-.
10. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350-355.
11. Bao S, Wu Q, McLendon RE *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444:756-760.
12. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2007;104:973-978.
13. Ang KK, Harris J, Wheeler R *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2010;363:24-35.

