

NEDERLANDSE SAMENVATTING

KANKER

Kanker is een ziekte die ontstaat door een opeenstapeling van beschadigingen (mutaties) in het DNA. Deze beschadigingen kunnen zowel erfelijk als verworven zijn. Voorbeelden van een erfelijke mutatie is die in het APC gen, waardoor dikke darm kanker kan ontstaan en die in het BRCA gen, waardoor borstkanker kan ontstaan. Mutaties kunnen worden geïnduceerd (verworven) door o.a. chemische stoffen als alcohol en door roken, die kunnen leiden tot bijvoorbeeld hoofd-hals kanker en longkanker. Door deze mutaties kunnen de cellen ongecontroleerd gaan delen, waardoor een kankergezwel ontstaat. Op dit moment is kanker een van de belangrijkste oorzaken van sterfte. Kanker is een groeiend probleem, onder andere vanwege de vergrijzing van de bevolking. Daarom is veel onderzoek nodig naar nieuwe behandelingen die effectiever zijn dan de bestaande.

BEHANDELING VAN KANKER

Van alle kankervormen die bestaan, is darmkanker de tweede oorzaak van gerelateerde dood in de Westerse wereld. In Nederland worden elk jaar ongeveer nieuwe patiënten met deze ziekte gediagnosticeerd. De meest effectieve behandeling van darmkanker is chirurgie, het operatief weghalen van de tumor. Wanneer dit niet mogelijk is, omdat de tumor te ver is ingegroeid in het omliggende weefsel of omdat de tumor is uitgezaaid, wordt chemotherapie gegeven. Chemotherapie bestaat meestal uit een combinatie van verschillende antikanker medicijnen. Voorbeelden van belangrijke antikanker medicijnen die gebruikt worden tegen darmkanker zijn de fluoropyrimidines, zoals 5-fluorouracil (5-FU) en 5'-deoxyfluorouridine, terwijl het nieuwe medicijn trifluorothymidine (TFT) op dit moment wordt getest in klinische studies. Deze medicijnen zijn gebaseerd op de bouwstenen van het DNA of RNA, maar hebben een kleine verandering ondergaan (de toevoeging van één of meerdere fluor-groepen) waardoor ze toxisch worden. Doordat deze middelen veel op de bouwstenen van het DNA lijken, volgen de medicijnen in de cellen de normale metabole (stofwisselings) routes. Na volledige activering, kunnen de fluoropyrimidines worden ingebouwd in het DNA of in het RNA en zorgen daar voor schade, waardoor de kanker cellen sterven. Een ander werkingsmechanisme van deze stoffen om kanker cellen te doden is door de remming van het enzym thymidylaat synthase (TS). Dit

Nederlandse samenvatting

enzym speelt een rol in de aanmaak van nieuwe bouwstenen van het DNA. Door de remming van dit enzym wordt extra schade aan de kankercellen aangebracht, waarna ze dood gaan.

CELDOOD

Celdood is een van de belangrijkste doelen in de behandeling van kanker met chemotherapie. Er bestaan meerdere vormen van celdood, waarbij verschillende eiwitten een sleutelrol spelen. Apoptose is geprogrammeerde celdood, waarbij de caspases een actieve rol spelen. Als er in de cel letale schade optreedt, worden de caspases geactiveerd, waarna de cellen dood gaan. Een ander eiwit dat een rol speelt in celdood is cathepsine B. Cathepsine B zit normaal gesproken in de lysosomen. Lysosomen zijn cellulaire structuren in de cel die voor de afbraak van macromoleculen zorgen. Wanneer de cel schade oploopt (zoals bij chemotherapie) breken de lysosomen en komt cathepsine B vrij in het cytoplasma. Cathepsine B maakt vervolgens specifiek verschillende eiwitten kapot, waardoor een necrotische celdood optreedt. Naast celdood kunnen ook overlevingseiwitten worden geactiveerd. Een voorbeeld van een overlevingsmechanisme is een proces dat autofagie heet. Autofagie wordt geactiveerd na het 'uithongeren' van cellen. Cellen komen in een speciale staat terecht, waarbij ze zichzelf voorzien van voedingsstoffen door eiwitten en celorganellen af te breken en hieruit energie te halen. Wanneer de condities weer worden hersteld zullen de tumor cellen verder gaan met delen. Autofagie kan ook worden geactiveerd door antikanker medicijnen, alhoewel het proces dan ook kan leiden tot celdood.

ANGIOGENESE

Angiogenese is de vorming van nieuwe bloedvaten uit de bestaande bloedvaten. Dit proces is belangrijk voor de groei van een tumor, maar speelt ook een rol bij normale fysiologische processen zoals ontstekingen of wond genezing. Wanneer een tumor groeit liggen de cellen steeds verder verwijderd van de bloedvaten, waardoor een gebrek ontstaat aan voedingsstoffen en zuurstof. Als reactie hierop zullen de kankercellen eiwitten uitscheiden, die ervoor zorgen dat nieuwe bloedvaten worden aangemaakt. Door het groeien van de nieuwe bloedvaten krijgt de tumor meer zuurstof en voedingsstoffen, waardoor de tumor verder kan groeien. Tegenwoordig worden veel nieuwe antikanker medicijnen tegen

angiogenese ontwikkeld. Door het remmen van angiogenese kan de tumor niet groeien, en zal de tumor zelfs kleiner worden.

INHOUD VAN DIT PROEFSCHRIFT

In dit proefschrift wordt het nieuwe medicijn TAS-102 beschreven. TAS-102 bestaat uit de combinatie van trifluorothymidine (TFT) met de thymidine phosphorylase inhibitor (TPI). Het enzym thymidine phosphorylase (TP) breekt TFT af. De toevoeging van TPI aan TFT zorgt voor verhoogde hoeveelheden beschikbaar TFT in het lichaam, en daarbij ook in de tumor. Daarnaast is TPI een potentiële remmer van de vorming van nieuwe bloedvaten vanuit bestaande bloedvaten naar de (groeïende) tumor, een proces dat angiogenese heet. In dit proefschrift is beschreven hoe resistentie kan optreden tegen het nieuwe antikanker medicijn trifluorothymidine (TFT; TAS-102), op welke manier celdood wordt geïnduceerd en waarom het effectiever kan zijn dan 5-fluorouracil. Daarnaast is bekeken hoe de antikanker effectiviteit verhoogd kan worden door TFT te combineren met de antikanker medicijnen, docetaxel en erlotinib. Veel tumoren hebben een verhoogde expressie van het enzym TP. Omdat TP angiogenese kan induceren, is TPI een potentiële remmer van angiogenese. In dit proefschrift worden mogelijke moleculaire mechanismen van TP in angiogenese beschreven, en de rol van TPI als angiogenese remmer.

TFT RESISTENTIE

Het optreden van resistentie is een belangrijke beperking voor de behandeling van patiënten met antikanker medicijnen. Daarom is het belangrijk om potentiële resistentie mechanismen tegen TFT te onderzoeken. In Hoofdstuk 2 is beschreven hoe resistentie kan worden geïnduceerd en welke vormen van resistentie tegen TFT mogelijk zijn. Om resistentie te induceren zijn twee toediening schema's van TFT onderzocht. Het eerste schema bestaat uit een continue blootstelling aan TFT, waarbij de concentratie TFT geleidelijk is verhoogd (H630-cTFT). Een tweede schema bestond uit het pulserend blootstellen van TFT, 4 uur per week, in toenemende concentraties TFT (H630-4TFT). H630-cTFT groeit in 20 μM TFT en is 336 keer ongevoeliger dan de H630 cellen. H630-4TFT groeit voor 4 uur per week in 250 μM TFT en is 1320 keer ongevoeliger dan H630. H630-4TFT was resistent tegen TFT, omdat het een verlaagde expressie had van het enzym thymidine kinase (TK), een enzym dat TFT activeert. Expressie van de enzymen TP en TS waren onveranderd. H630-cTFT was resistent tegen TFT, maar had geen veranderde expressies in de enzymen TK, TP en

Nederlandse samenvatting

TS. Daarom is een mRNA microarray analyse uitgevoerd, waarbij bijna alle genen uit het genoom getest worden. Hieruit bleek dat het eiwit 'secretory phospholipase A2 type IIA' (sPLA2 IIA) sterk verhoogd was. Wanneer sPLA werd geremd, was de resistentie tegen TFT verminderd. sPLA2 speelt daarom een belangrijke rol in TFT resistentie. sPLA2 speelt een rol in de cyclooxygenase (COX) route. COX synthetiseert vanuit arachidonzuur de prostaglandines. sPLA2 speelt ook een belangrijke rol in de ontwikkeling in kanker, met name darmkanker. De exacte rol van sPLA2 in TFT resistentie zal nader onderzocht moeten worden.

TFT EN CELDOOD

Celdood is een van de belangrijke doelen van antikanker medicijnen. DNA schade kan worden herkend door het eiwit p53. p53 is vaak gemuteerd in darmkanker, wat leidt tot een versterkte tumor groei. Het is daarom belangrijk om te weten of TFT actief kan zijn in darmkanker met mutaties in het p53 gen. Dit is onderzocht met behulp van cellijnen die zijn getransfecteerd met een wild type of mutant p53 gen (Hoofdstuk 3). Het bleek dat p53 mutaties de cytotoxische activiteit van TFT niet beïnvloeden. Dit is in tegenstelling tot 5-FU, waarbij p53 potentieel wel belangrijk is voor de inductie van celdood. Dit is een belangrijk voordeel van TFT ten opzichte van 5-FU.

TFT kan actief zijn in cellijnen die resistent zijn tegen 5-FU, en resultaten van een klinische studie lieten zien dat TFT actief was in een patiënt die resistent was tegen 5-FU. Daarom is onderzocht of er verschillen zijn in het mechanisme van celdood (Hoofdstuk 4). TFT en 5-FU activeerden dezelfde route van celdood. Deze route was verschillend per cellijn die was gebruikt. In een van de cellijnen werd de extrinsieke apoptotische celdood geactiveerd, in een andere de intrinsieke apoptotische celdood. Cathepsine B werd geactiveerd, wat deels tot een celdood leidde met necrotisch eigenschappen. In de cellijn Colo320 werden de caspases nauwelijks geactiveerd, was de celdood necrotisch en grotendeels onafhankelijk van cathepsine B. Alhoewel TFT en 5-FU weinig verschilden in de activeringsroute van celdood, werd celdood in een sterkere mate geïnduceerd door TFT dan door 5-FU. Daarnaast werd door 5-FU het overlevingsmechanisme autofagie geactiveerd. Autofagie zorgde ervoor dat de cellen, na het wegwassen van 5-FU, verder gingen in hun celdeling. Dit is in overeenstemming met resultaten uit een *in vivo* muizen experiment, waaruit bleek dat TAS-102 voor een sterkere celdood inductie en cel groeiremming zorgt dan de 5-FU analoog 5'-DFUR. Dit bevestigt dat TFT een belangrijke rol kan hebben naast de behandeling met 5-FU in darmkanker.

VERHOGEN VAN EFFECTIVITEIT VAN TFT DOOR COMBINATIES

De behandeling van kanker bestaat grotendeels uit combinatie-behandelingen met verschillende medicijnen. Combinaties blijken vele malen effectiever te zijn dan monotherapie. 5-FU wordt momenteel in combinatie met oxaliplatin of irinotecan gegeven. Andere combinaties met 5-FU bestaan uit de nieuwe generatie tyrosine kinase en angiogenese remmers. Het combineren van TFT met andere medicijnen kan daarom de antikanker effectiviteit vergroten. Docetaxel is een taxaan die microtubuline remt, waardoor cellen in de G₂/M-fase van de cel cyclus worden geremd. Omdat TFT cellen remt in deze fase, zou een combinatie effectief kunnen zijn. In hoofdstuk 5 wordt de combinatie van TFT met docetaxel beschreven. De combinatie was effectief, wanneer docetaxel 24 uur voordat de combinatie aan de darmkanker cellen werd gegeven. Dit is in tegenstelling tot de combinatie waar TFT 24 h van te voren werd gegeven. Deze combinatie was sterk antagonistisch. Synergie was gerelateerd aan een hogere inductie van celdood, polyploidie en de vorming van afwijkende mitotische spindles.

Ongeveer 80% van de darmkanker patiënten hebben een verhoogde expressie van de epidermale groei factor receptor (EGFR). EGFR is een receptor die als potentiële target wordt gezien tegen kanker. De combinatie van TFT met de EGFR remmer erlotinib is beschreven in hoofdstuk 6. Een combinatie van TFT met erlotinib was synergistisch, onafhankelijk van het toedingschema. De synergie was het sterkste in de cellijn die gevoelig was voor erlotinib en die geen mutaties had in de EGFR-route. In de cellijnen die redelijk gevoelig waren voor erlotinib waren de combinaties synergistisch. TFT activeerde de overlevings route van EGFR, Akt en MAPK. De activering van deze route is al eerder beschreven voor platinum analogen, zoals cisplatinum. Wanneer erlotinib werd toegevoegd aan TFT, werd de overlevingsroute niet geactiveerd. Daarnaast werden cellen in hun celcyclus geremd en werd DNA schade geïnduceerd. Helaas is erlotinib niet effectief gebleken tegen darmkanker, maar de studie beschreven in hoofdstuk 6 laat zien dat TFT met een EGFR remmer effectief kan zijn. Toekomstige experimenten kunnen focussen op een combinatie van TFT met andere nieuwe-generatie tyrosine kinase remmers.

ROL VAN THYMIDINE PHOSPHORYLASE IN ANGIOGENESE

Thymidine phosphorylase (TP) kan angiogenese induceren. Veel studies hebben duidelijk een relatie aangetoond tussen de expressie van TP in tumoren en de inductie van angiogenese. De exacte rol van TP in angiogenese blijft nog onduidelijk. TP zet thymidine

Nederlandse samenvatting

om naar thymine en deoxyribose-1-fosfaat (dR-1-P). Deoxyribose (dR) kan uit dR-1-P worden gevormd, en kan ook worden uitgescheiden door de cellen. Hierdoor zou het endotheelcellen kunnen aantrekken om nieuwe bloedvaten te vormen. Door anderen is eerder aangetoond dat dR de angiogene eigenschappen van endotheelcellen kan verhogen. Het blijft alleen onduidelijk of dR dé angiogene mediator is die ten grondslag ligt aan de angiogene activiteit van TP. De mogelijke rol van TP in angiogenese is beschreven in hoofdstuk 7 in een review.

De suikers dR, dR-1-P en deoxyribose-5-fosfaat (dR-5-P) zijn de eerste metabolieten na de omzetting van thymidine naar thymine door TP. dR kan worden uitgescheiden, en is angiogeen, maar het is nooit bewezen dat dR daadwerkelijk wordt uitgescheiden na omzetting van thymidine. Ook is het onbekend in welke mate de overige suikers worden gevormd en accumuleren in de cellen. Hoofdstuk 8 beschrijft welke suikers worden gevormd en uitgescheiden door cellen met een hoge TP expressie. dR-1-P en dR-5-P werden snel gevormd en verder gemetaboliseerd, maar de mate van accumulatie was verschillend per cellijn. Dit is in overeenstemming met eerdere resultaten, waarin een snelle verdwijning van dR-1-P werd gevonden. Om te bepalen of de suikers een rol spelen in de uitscheiding van andere producten, zoals bovengenoemde angiogene factoren, zijn de celfracties waarin de suikers accumuleren zijn gescheiden en is bepaald hoeveel in deze fracties terecht kwam. De suikers bleken voornamelijk aanwezig te zijn in het cytoskelet en in de celmembraan. Ook werd een groot deel weer uitgescheiden na 24 uur, alhoewel daarvan een kleine fractie aan de eiwitten gebonden was. De aanwezigheid van suikers in het celmembraan kan gerelateerd zijn aan de vorming van suiker-eiwitten (glycoproteïns), die belangrijk kunnen zijn voor de cel signalering en celmotiliteit. Ook kunnen de suikers tot AGEs worden omgezet, die een rol kunnen spelen in cel migratie. In toekomstige studies zal onderzocht moeten worden wat de rol is van dit type eiwitten in TP gemedieerde angiogenese.

Een recent model van angiogenese wordt gevormd door de endotheel voorloper cellen (EPCs). Deze endotheelcellen circuleren in het bloed en zijn afkomstig uit het beenmerg. De tumoren scheiden angiogene factoren uit, waarna deze circulerende endotheelcellen naar de tumor migreren en daar voor de vorming van nieuwe bloedvaten zorgen. In hoofdstuk 9 is de rol van TP in angiogenese beschreven in deze EPCs en vergeleken met het standaard HUVEC model (humane navelstreng endotheelcellen). Cellen werden gestimuleerd met TdR, dR en geremd met TPI en L-dR. dR en TdR konden de migratie van HUVECs stimuleren en dR die van EPCs. TPI en L-dR remden de migratie en invasie niet.

In HUVECs is verder onderzocht hoe tumorcellen met een hoge TP expressie, vergeleken met dezelfde cellen zonder TP expressie, angiogenese kunnen stimuleren (Hoofdstuk 10). Dit is gedaan door geconditioneerd medium te gebruiken en de endotheel

cellen bloot te stellen, waarna verschillende angiogene eigenschappen zijn bepaald, zoals de migratie en invasie. Het medium afkomstig van tumor cellen met een hoge TP expressie stimuleerde de migratie en invasie in grotere mate dan het medium afkomstig van tumor cellen zonder TP expressie. TPI en L-dR konden deze migratie en invasie remmen, wat een rol suggereert voor TP en dR. TP expressie ging significant omhoog in endotheelcellen na blootstelling aan het medium van Colo320 TP1, maar niet na dat van RT112/TP. De TP activiteit bleef onveranderd na blootstelling aan het medium van Colo320 en RT112. Vervolgens is een RT-PCR uitgevoerd om te bepalen welke angiogene factoren een verhoogde mRNA expressie hadden. Daaruit bleek dat IL-8 sterk verhoogd was in RT112/TP, maar niet tot expressie kwam in Colo320 en Colo320 TP1. bFGF en TNF- α waren verhoogd in de TP-cellijnen. IL-8 bleek verhoogd te zijn in het geïnduceerde medium. Om te bepalen of deze factoren ook echt een rol speelden in de geïnduceerde migratie en invasie zijn specifieke antilichamen gebruikt, die het effect van de angiogene factoren kunnen blokkeren. Alle antilichamen konden de migratie en invasie remmen van de factoren die ook duidelijk verhoogd waren in de TP-lijnen. Hieruit kunnen we concluderen dat tumorcellen met een verhoogde TP expressie tot een verhoogde expressie van verschillende factoren kan leiden, wat kan zorgen voor de verhoogde angiogenese inductie.

CONCLUSIE

Het nieuwe antikanker medicijn TAS-102 bestaat uit de combinatie van TFT met TPI. TFT biedt voordelen ten opzichte van 5-FU, omdat TFT tot een verhoogde celdood leidde, terwijl de kankercellen tegen 5-FU een beschermingsproces (autofagie) activeerden. De cytotoxiciteit van TFT kon worden versterkt door het te combineren met docetaxel of erlotinib. Deze aspecten moeten in verdere details onderzocht worden voor de introductie in klinische studies. TP kan angiogenese stimuleren en TPI kan dit proces remmen. Daarnaast zorgt TPI voor een verhoogde aanwezigheid van TFT door het remmen van TFT afbraak. Het anti-angiogene effect van TPI zal verder onderzocht moeten worden in *in vivo* modellen. Ter conclusie, het nieuwe antikanker medicijn TAS-102 biedt veelbelovende mogelijkheden als antikanker medicijn voor de behandeling van maag- en darmkanker.