

**Samenvatting**

---

**Dutch summary - Nederlandse samenvatting**

## Nederlandse samenvatting

Kanker is in de westerse wereld een van de belangrijkste oorzaken van sterfte. De ziekte kenmerkt zich door ongecontroleerde groei van cellen. Onder normale omstandigheden is de groei van cellen in het lichaam strak georganiseerd en vindt alleen plaats wanneer dat nodig is. De cellen in ons lichaam staan bloot aan allerlei factoren zoals UV-straling van de zon en chemische stoffen die we binnenkrijgen door voeding of roken. Deze factoren kunnen negatief van invloed zijn op het erfelijke materiaal, DNA, wat zich in de kern van cellen bevindt. Beschadigingen, mutaties genaamd, van het DNA moeten eerst hersteld worden voor dat een cel zich weer gaat delen. In de loop van de tijd kunnen er echter een opeenstapeling van mutaties optreden die niet meer gerepareerd kunnen worden. Cellen met teveel mutaties in het DNA dienen opgeruimd te worden via een proces dat geprogrammeerde celdood of apoptose heet. Indien de beschadigingen in het DNA hebben plaats gevonden niet adequaat hersteld worden kan het gevolg zijn dat de normale groei en sterfte van de cellen ontregeld raken en er ongecontroleerde groei gaat plaatsvinden wat leidt tot het ontstaan van kankergezwellen.

De overleving van kanker is sterk afhankelijk van het stadium van de kanker op het moment dat het wordt vastgesteld. Indien de tumor nog niet te ver in omliggend weefsel is ingegroeid kan deze operatief verwijderd worden en is de kans op volledige genezing het grootst. Is de tumor daarentegen diep in omliggende weefsel doorgedrongen of zelfs verspreid naar andere organen dan is chemotherapie de enige optie en is de kans op genezing sterk verminderd.

Al meer dan vijftig jaar maakt 5-fluorouracil (5-FU) onderdeel uit van de chemotherapie van darmkanker. In eerste instantie werd alleen 5-FU gebruikt maar sinds het laatste decennium van de vorige eeuw werd hieraan leucovorin toegevoegd dat de werking van 5-FU versterkt en meer recent ook het antikanker medicijn oxaliplatin. Deze drie middelen samen (FOLFOX) vormen nu de standaard chemotherapie voor darmkanker. Een alternatief is de combinatie van 5-FU en leucovorin met irinotecan, een topoisomerase I remmer (FOLFIRI). Nog recenter zijn cetuximab en bevacizumab aan de behandeling van darmkanker toegevoegd. Cetuximab voorkomt de binding van een groeistimulerende stof aan de tumorcellen terwijl bevacizumab de vorming van bloedvaten remt waardoor de tumor minder voedingsstoffen krijgt. Ondanks de verlenging van overleving door de hedendaagse chemotherapie is de gemiddelde overleving van uitgezaaide darmkanker nog erg kort (ca twee jaar) en moet de behandeling sterk verbeterd worden. Verbetering van de behandeling kan bereikt worden door ontwikkeling van nieuwe antikanker medicijnen

die heel specifiek aangrijpen op tumor cellen maar ook door het beter begrijpen hoe de huidige middelen werken waardoor het mogelijk wordt om de toediening van deze middelen te verbeteren of het effect te optimaliseren.

Dit proefschrift beschrijft de werking van 5-FU en oxaliplatin die de basis vormen van de hedendaagse behandeling van uitgezaaide darmkanker.

Aan de basis van de ontwikkeling van 5-FU staat de ontdekking dat tumorcellen meer uracil opnemen dan normale cellen. Deze observatie heeft geleid tot de ontwikkeling van verschillende verwante stoffen, waarvan 5-FU het meeste effect had. De werking van 5-FU is voornamelijk gebaseerd op de remming van het enzym thymidylaat synthase. Remming van dit enzym heeft tot gevolg dat een van de vier bouwstenen van het DNA minder aangemaakt wordt in de tumorcel. Hierdoor kan de tumorcel minder goed delen. Er is door de jaren heen heel veel onderzoek gedaan naar de remming van dit enzym en hoe dit verbeterd kan worden. Een van de resultaten heeft geleid tot de toevoeging van leucovorin aan de behandeling. Deze stof zorgt er voor dat het enzym thymidylaat synthase nog beter geremd wordt en de deling van de tumorcellen nog sterker verminderd wordt. Ook is er veel onderzoek verricht naar hoe de tumorcel zich aan de behandeling aanpast zodat het effect van de behandeling weer verminderd wordt. 5-FU heeft echter nog twee werkingsmechanismen. Het kan namelijk dienen als foutieve bouwsteen voor zowel DNA als RNA, dat voor de aanmaak van eiwitten verantwoordelijk is. Indien 5-FU ingebouwd wordt in RNA verstoort dit de aanmaak van eiwitten wat kan leiden tot verminderde groei van de tumorcel. Als 5-FU ingebouwd is in het DNA dan probeert de tumorcel dit te repareren wat als gevolg heeft dat er breuken in het DNA ontstaan. Deze breuken zorgen er ook voor dat de tumorcellen minder goed kunnen delen en dood gaan. Er is veel onderzoek gedaan in het laboratorium naar de inbouw van 5-FU in het RNA en DNA van tumorcellen. Dit heeft aangetoond dat dit inderdaad bijdraagt aan de antikanker werking van 5-FU. Of dit een grote rol speelt tijdens de behandeling van patiënten is echter onduidelijk gebleven. In de hoofdstukken 2 tot en met 4 van dit proefschrift hebben we beschreven wat de rol van de inbouw in het RNA en DNA van tumoren is tijdens de behandeling van patiënten met darmkanker. Hiervoor hebben we eerst een methode ontwikkeld om de inbouw in RNA en DNA in tumormateriaal van patiënten te kunnen meten en daarna gekeken of dit een relatie heeft met het effect van de behandeling. Om de inbouw te kunnen meten hebben we allereerst het RNA en DNA uit het tumormateriaal geïsoleerd. Vervolgens hebben we het RNA en DNA helemaal afgebroken tot we alleen de zogenaamde basen overhadden. Deze basen kunnen met standaard methodes erg gevoelig gemeten worden. De metingen laten zien dat tijdens de behandeling van patiënten inderdaad inbouw van 5-FU in

zowel RNA en DNA plaatsvindt en dat deze inbouw tot 3 dagen na de behandeling nog steeds aantoonbaar is. Echter de mate van inbouw van 5-FU in RNA en DNA was niet gecorreleerd met het effect van de behandeling. De remming van het enzym thymidylaat synthase in het zelfde tumormateriaal gaf wel een correlatie te zien met het effect van de behandeling. Het lijkt er dus op dat de werking van 5-FU het meest afhankelijk is van de remming van het enzym thymidylaat synthase.

In de hoofdstukken 5 en 6 is onderzoek naar de werking van oxaliplatin beschreven. De gangbare theorie stelt dat oxaliplatin na opname in de tumorcel bindt aan het DNA. Deze binding van oxaliplatin zorgt er voor dat er een buiging in DNA ontstaat wat tot gevolg heeft dat er geen goede verdubbeling van het DNA kan plaatsvinden dat nodig is voor deling van de cellen. De tumorcel probeert de stukjes DNA met het gebonden oxaliplatin te verwijderen en te vervangen door nieuwe bouwstenen. Als dit niet lukt dan wordt de beschadigde cel opgeruimd via geprogrammeerde celdood. In hoofdstuk vijf beschrijven we hoe goed oxaliplatin verschillende tumorcellen in het laboratorium kan doden. Daarnaast hebben we gekeken naar factoren die hierin een rol kunnen spelen. Deze factoren zijn onder andere: de opname van oxaliplatin in de tumor cel, de binding van oxaliplatin aan het DNA, de aanwezigheid van mutaties in een bepaald deel van het DNA dat codeert voor een heel belangrijk eiwit (p53) en in welke fase van de celdeling de cellen geremd worden. De resultaten laten zien dat er voor de hele groep van verschillende tumorcellen geen relatie bestaat tussen de activiteit van oxaliplatin en de opname van oxaliplatin in de cellen en ook niet met de binding van oxaliplatin aan het DNA. De aanwezigheid van mutaties in het DNA dat codeert voor het eiwit p53 had geen effect op de activiteit van Oxaliplatin. In cellen waar het eiwit p53 niet actief was, had oxaliplatin echter minder effect. In deze cellen werd minder oxaliplatin opgenomen en daardoor was er ook minder aan het DNA gebonden. Oxaliplatin zorgt dat de tumorcellen in verschillende fases van de celdeling geremd kan worden en dat dit verschilt voor tumorcellen waarvan het DNA wel of niet mutaties heeft in het deel dat codeert voor het eiwit p53. Naast oxaliplatin is in deze cellen ook cisplatin getest. In cellen die minder gevoelig waren voor cisplatin bleek dat de eiwitten die zorgen voor opname van cisplatin verlaagd waren. In hoofdstuk zes wordt beschreven hoe tumor cellen zich kunnen aanpassen aan langdurige behandeling met oxaliplatin. Door deze aanpassingen worden de tumorcellen ongevoelig (resistent) voor oxaliplatin waardoor het effect van de behandeling verminderd wordt. Voor deze studie hebben we zowel darmkankercellen als baarmoederhalskankercellen resistent gemaakt tegen oxaliplatin door ze aan heel weinig oxaliplatin bloot te stellen en dit heel langzaam te verhogen zodat de cellen zich kunnen aanpassen. Dit heeft ongeveer een half jaar geduurd. Vervolgens

hebben we onderzocht hoe de cellen zich aangepast hebben. Een van de belangrijkste resultaten is dat de cellen minder oxaliplatin opnemen wat tot gevolg heeft dat er ook minder aan het DNA bindt. Verminderde opname van antikanker medicijnen is een veel beschreven reden voor verminderde gevoeligheid. De verminderde opname van oxaliplatin ging gepaard met een verlaging van de activiteit van eiwitten die oxaliplatin in de cel kunnen opnemen, zogenaamde transporters. Vooral de verlaging van 3 recent ontdekte transporters was opvallend (OCT1,2&3). Ook werd er een toename gezien van eiwitten die er voor kunnen zorgen dat oxaliplatin de cel wordt uitgepompt. Opname van oxaliplatin liet een sterke relatie zien met het effect van oxaliplatin op deze ongevoelige cellen. De binding van oxaliplatin aan het DNA was niet een sterke relatie met het effect van oxaliplatin. Dit geeft aan dat niet alleen binding aan het DNA belangrijk is voor het effect van oxaliplatin maar dat er ook andere factoren een rol spelen. Verlaging van opname van oxaliplatin in de cellen kon niet de ongevoeligheid van alle verschillende cellen verklaren. Om uit te vinden welke andere factoren een rol zouden kunnen spelen in de ongevoeligheid voor oxaliplatin hebben we gekeken naar het niveau van het RNA van alle genen in deze cellen. Deze experimenten lieten zien dat eiwitten die van belang zijn voor geprogrammeerde celdood verlaagd waren. Deze verlaging zorgt er voor dat het geprogrammeerde celdood proces verlaagd is waardoor de tumor cellen toch overleven. Tevens werden er verhoogde niveaus gevonden van genen die reparatie van DNA bevorderen.

Kennis van de werking van antikanker medicijnen en overlevings tactieken van tumorcellen maakt het mogelijke nieuwe therapieën te ontwikkelen. Er zijn nog verschillende mogelijkheden om de werking van 5-FU te versterken. In de literatuur zijn verschillende middelen beschreven die inbouw in RNA en DNA van 5-FU kunnen verhogen en daardoor misschien het uiteindelijke effect van 5-FU kunnen verhogen. Ook zijn er middelen die de ongevoeligheid voor oxaliplatin kunnen tegengaan. De recente toevoeging van cetuximab en bevacizumab aan de behandeling heeft een groot effect gehad op de overlevingsduur van patiënten met uitgezaaide darmkanker. In de toekomst zullen meer van dit type medicijnen beschikbaar komen zodat de overleving nog verder verbeterd kan worden. Tevens zijn de hedendaagse technieken om tumormateriaal van patiënten te onderzoeken zo ontwikkeld dat in de nabije toekomst op maat gemaakte therapie kan worden gegeven. Een grotere verbetering mag verwacht worden als we een kleine en specifieke groep cellen in een tumor, de zogenaamde kankerstemcellen of tumorinitiërende cellen, kunnen uitschakelen. Deze cellen zijn verantwoordelijk voor het in stand houden van de tumor en ongevoelig voor de meeste therapieën. De grote uitdaging is daarom deze cellen te identificeren en vervolgens nieuwe middelen te ontwikkelen die specifiek op deze cellen aangrijpen.

