

CHAPTER 9



Samenvatting



Primaire hooggradige hersentumoren vormen een ernstig probleem voor zowel volwassenen als kinderen. Ondanks de multimodale behandeling van deze hersentumoren, bestaande uit chirurgie, radiotherapie en chemotherapie, blijft de prognose voor patiënten slecht, met name voor patiënten met bepaalde vormen van medulloblastoom en voor patiënten met hooggradige gliomen (glioblastoma multiforme; GBM, diffuus intrinsiek pontine glioom; DIPG). Therapieresistentie is één van de voornaamste obstakels voor de effectieve behandeling van deze patiënten. Daarnaast gaan de huidige therapieën vaak gepaard met ernstige bijwerkingen. Daarom zijn nieuwe behandelingsstrategieën dringend nodig voor hooggradige hersentumoren. In dit proefschrift onderzoeken we wat de mechanismen zijn die ten grondslag liggen aan de resistentie tegen de behandeling van hooggradige hersentumoren en vervolgens proberen we in te grijpen in deze resistentiemechanismen, met als doel de huidige behandeling van GBM, medulloblastoom en DIPG te verbeteren.

In **hoofdstuk 2** onderzoeken we mechanismen die ten grondslag liggen aan temozolomide (TMZ)-resistentie in GBM met behulp van een *in vitro* TMZ-resistentie model bestaande uit drie TMZ-gevoelige wild-type GBM cellijnen (U87, Hs683 en LN2308) en hun zes TMZ-resistente subklonen. Via genexpressieprofielering van deze cellijnen, identificeerden we EFEMP1 als een eiwit betrokken bij TMZ-resistentie. We lieten zien dat een toename van EFEMP1 expressie is geassocieerd met een TMZ-resistent fenotype, terwijl een afname van EFEMP1 expressie met behulp van een siRNA resulteerde in een verminderde overleving van de cellen na TMZ-behandeling. EFEMP1 kan zijn effect uitoefenen via verscheidene signaleringsroutes, waaronder de Notch-signaleringsroute. Remming van deze Notch-signaleringsroute middels de gamma-secretase remmer RO4929097 zorgde voor een gedeeltelijke verbetering van de gevoeligheid van GBM cellen voor TMZ, zowel *in vitro* als *in vivo*. Daarnaast lieten we zien dat de mRNA-expressie van EFEMP1 correleert met de overleving van patiënten die behandeld zijn met TMZ. Een hoge expressie van EFEMP1 is hierin gecorreleerd met een verminderde overleving. De resultaten in dit hoofdstuk geven aan dat EFEMP1 een potentiële target is om TMZ-resistentie in GBM teniet te doen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de bruikbaarheid en haalbaarheid van een integratieve miRNA/mRNA netwerkanalyse om factoren betrokken bij TMZ-resistentie in GBM te identificeren. In dit hoofdstuk maakten we opnieuw gebruik van het TMZ-resistentiemodel van TMZ-gevoelige en TMZ-resistente GBM-cellen. De miRNA-profielen van deze cellijnen werden bepaald en vervolgens werden deze profielen samen met de mRNA-profielen (bepaald in hoofdstuk 2) geïntegreerd met behulp van de netwerkanalysetool mirConnX. We identificeerden de plant-homeodomain (PHD)-like finger 6 (PHF6) als potentiële TMZ-resistentiefactor in de TMZ-resistente cellen. Analyse van de PHF6-mRNA en eiwitexpressie in GBM en normaal weefsel liet zien dat PHF6 over het algemeen hoger tot expressie komt in GBM in vergelijking met normaal weefsel. Om te bepalen of PHF6 functioneel betrokken is bij TMZ-resistentie, hebben we de expressie van PHF6 verlaagd in drie TMZ-resistente subklonen met behulp van

een siRNA tegen PHF6 en hebben we vervolgens de cellen behandeld met TMZ. Een afname van PHF6 expressie in combinatie met TMZ-behandeling resulteerde in een significante toename van celdood in twee van de drie subklonen. Deze resultaten geven aan dat de analyse van miRNA/mRNA-netwerken met behulp van mirConnX nuttig en haalbaar is voor de identificatie van TMZ-resistentiefactoren in TMZ-resistente GBM cellen.

In hoofdstuk 4 werd het TMZ-resistentiemodel van TMZ-gevoelige en TMZ-resistente GBM-cellijnen nog eenmaal gebruikt om therapeutische middelen te identificeren die GBM-cellen gevoeliger kunnen maken voor TMZ. Middels een drugscreen, identificeerden we hydroxyurea (HU) als een potentiële 'TMZ-sensitizer'. Verdere evaluatie van HU in nieuw gediagnosticeerd primair GBM en TMZ-resistent recidief GBM liet zien dat HU het TMZ-effect op celoverleving kan versterken, ongeacht de MGMT-promotermethylatiestatus van de cellen. Een beschreven target van HU is de ribonucleotide reductase subeenheid M2 (RRM2), een enzym betrokken bij nucleotidemetabolisme. Het remmen van dit enzym zou *de novo* DNA-synthese kunnen beperken. Knockdown van RRM2 in combinatie met TMZ liet hetzelfde effect zien op celoverleving als HU in combinatie met TMZ, namelijk het effect van TMZ op de GBM cellen werd versterkt. Eerdere studies tonen aan dat HU een beperkte effectiviteit heeft als therapeutisch middel voor kwaadaardige gliomen. Echter, dit hoofdstuk laat voor de eerste keer zien dat HU, in combinatie met TMZ, potentie heeft als adjuvante therapie voor GBM patiënten.

Hoofdstuk 5 richt zich op de flavonoïde quercetine als potentiële 'radiosensitizer' voor medulloblastoom. Quercetine werd geïdentificeerd als potentiële 'radiosensitizer' aan de hand van een drugscreen in DAOY cellen welke uit 960 'small molecule' remmers bestond. Vervolgens hebben we de radiosensitiserende werking van quercetine ook aangetoond in de medulloblastoomcellijnen, D283 en D458, en lieten we zien dat slechts lage concentraties van quercetine nodig zijn om deze cellen gevoeliger te maken voor straling. Daarnaast hebben we het effect van quercetine ook in gezonde cellen getest, namelijk neurale precursor cellen en normale menselijke fibroblasten en het bleek dat quercetine geen invloed heeft op de proliferatie van deze cellen. Het radiosensitiserende effect van quercetine werd niet waargenomen in primaire medulloblastoomcellen. Dit kwam waarschijnlijk door de hoge intrinsieke stralingsgevoeligheid van deze cellen en daardoor kan quercetine de gevoeligheid voor straling niet verder verbeteren. *In vivo* analyse van quercetine in een D283-xenograft muismodel liet zien dat quercetine in combinatie met straling de overleving van muizen kan verlengen in vergelijking met de behandeling met quercetine of straling alleen. Aangezien medulloblastomen worden onderverdeeld in vier verschillende moleculaire subgroepen, hebben we bepaald of het effect van quercetine op de stralingsrespons subgroep-afhankelijk is. DAOY cellen werden geïdentificeerd als een Sonic Hedgehog (SHH)-medulloblastoom, terwijl de D283 en D458 behoren tot de groep 3 medulloblastomen. Dit geeft aan dat het radiosensitiserende effect van quercetine in medulloblastoom subgroep-onafhankelijk

is. Deze resultaten tonen dat quercetine potentie heeft als 'radiosensitizer' voor de behandeling van medulloblastoompatiënten.

In hoofdstuk 6 bepaalden we of de WEE1-kinaseremmer MK-1775 de stralingsrespons van DIPG zou kunnen verbeteren. Radiotherapie is de standaardbehandeling voor patiënten met DIPG aangezien geen enkel ander middel effectief is gebleken in de behandeling van deze kwaadaardige hersentumor. WEE1-kinase is één van de belangrijkste poortwachters van de G2-checkpoint in de celcyclus. In dit checkpoint wordt straling-geïnduceerde DNA-schade gerepareerd. Hier lieten we zien dat WEE1-kinase hoog tot expressie komt in DIPG in vergelijking met niet-neoplastisch hersenweefsel. Remming van WEE1-kinase in DIPG cellen met behulp van de klinisch relevante remmer MK-1775 resulteerde in een afname van de stralingsgeïnduceerde, door WEE1-gereguleerde, fosforylatie van CDC2 en een verminderd oponthoud van de celdeling in de G2-M-fase van de celcyclus. Dit resulteerde vervolgens in verminderde levensvatbaarheid van de behandelde DIPG cellen. Daarnaast hebben we aangetoond dat MK-1775 de stralingsrespons in een E98-Fluc-mCherry-xenograft muismodel kan verbeteren. Dit geeft aan dat remming van WEE1-kinase in combinatie met radiotherapie een interessante optie is voor de behandeling van DIPG.

In hoofdstuk 7 worden de in dit proefschrift beschreven resultaten bediscussieerd en in een bredere context geplaatst.

