

## Nederlandse Samenvatting

Kanker is na hart en vaatziekten de tweede doodsoorzaak door ziekte in de westerse wereld. Er is in de laatste jaren veel vooruitgang geboekt in de behandeling van kanker met behulp van o.a. chemotherapie en bestraling. Bij deze vormen van kankertherapie ontstaan echter veel bijwerkingen omdat niet alleen kankercellen worden gedood, maar ook normale gezonde cellen. Een andere veelbelovende therapie is immuuntherapie. Het doel van immuuntherapie is het induceren en/of activeren van afweercellen zodat zij tumorcellen kunnen doden. De zogenaamde killer T-cel (CTL) kan stukjes eiwit die alleen, of in sterk verhoogde hoeveelheden in tumorcellen voorkomen en niet, of slechts in lage hoeveelheden aanwezig zijn in gezonde cellen [tumor geassocieerde antigenen (TAA)] herkennen als zij in de context van de zogenaamde transplantatie antigenen (HLA) gepresenteerd worden. HLA antigenen zitten op het oppervlak van alle normale kernhoudende cellen. Nadat de CTL TAA gepresenteerd door HLA herkent, kan deze de tumor cel doden. Echter in veel gevallen verdwijnt het HLA van het oppervlak van tumor cellen en kan de CTL deze niet meer herkennen. Op dit moment wordt een tweede type “killer” cel van belang, de zogenaamde natural killer (NK) cel. Dit type killer cel laat alle normale cellen met HLA op het oppervlak met rust, maar zal cellen die geen HLA op het oppervlak meer hebben, bijvoorbeeld door ontaarding als kankercel, juist actief doden. Dit kunnen zij op twee manieren, direct of via herkenning van antistoffen die gebonden zijn aan de tumor cel. Het laatste mechanisme wordt ook wel “antibody dependent cellular cytotoxicity” of ADCC genoemd. ADCC is één van de belangrijkste mechanismen van tumor specifieke monoklonale antistof therapie. Antistoffen bestaan uit een constant gedeelte en een variabel gedeelte, het variabele gedeelte is voor elke antistof anders en bepaalt waar deze aan zal binden, bijvoorbeeld een bepaald eiwit wat alleen op het oppervlakte van tumor cellen voorkomt maar niet op normale cellen. Een bekend voorbeeld van zo'n eiwit is MUC1, wat veel voorkomt op borst- en eierstokkanker cellen. NK cellen hebben een receptor voor het constante gedeelte van de antistof. Na binding van een antistof die met het variabele deel vast zit aan de tumor cel en met het constante deel aan de NK cel, wordt de NK cel aangezet tot het doden van de tumor cel.

Bij de zogenaamde niet-specifieke immuuntherapie wordt de patiënt behandeld met stoffen die een algemene activering van het afweer systeem veroorzaken (cytokinen). Omdat bij deze vorm van immuuntherapie het gehele immuunsysteem sterk wordt geactiveerd, gaat deze behandeling ook gepaard met relatief veel bijwerkingen en daarnaast zijn de resultaten helaas teleurstellend. Bij specifieke immuuntherapie wordt het afweersysteem gestimuleerd door middel van vaccinatie met TAA om TAA specifieke CTL te induceren die vervolgens tumor cellen kunnen doden maar gezonde cellen met rust laten. Deze vorm van immuuntherapie heeft dan ook relatief weinig bijwerkingen, en de eerste resultaten zijn veelbelovend. Om voldoende en effectieve tumorcel herkende CTL te induceren is het noodzakelijk om de TAA aan te bieden op het HLA van een gespecialiseerd celtype; de dendritische cel (DC). Na activering is de DC het enige celtype wat in staat is primaire TAA specifieke CTL te induceren. Huidige vaccinatie strategieën maken dan ook vaak gebruik van geactiveerde DC gegenereerd uit het bloed van patiënten die met TAA eiwit zijn beladen en vervolgens teruggegeven worden aan de patiënt. Naast DC zijn ook bepaalde cytokinen nodig om een effectieve antitumor CTL respons op te wekken. Echter, zoals eerder genoemd, systemische behandeling met cytokinen leidt tot ernstige bijwerkingen.

Invariante Natural killer T (iNKT) cellen zijn afweer cellen die kort na activering zelf relatief grote hoeveelheden cytokinen kunnen uitscheiden. Door deze eigenschap spelen zij een belangrijke rol in de regulatie van afweerreacties, o.a. de versterking van de afweerreactie gericht tegen tumoren. iNKT cellen worden, net als CTL, geactiveerd door DC. Zij herkennen echter geen eiwitten maar bepaalde suikervetten (o.a. het uit een zeespons geïsoleerde  $\alpha$ -

Galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer)) gepresenteerd door het CD1d molecuul. Studies in muizen tumormodellen hebben aangetoond dat na toediening van  $\alpha$ -GalCer het aantal iNKT cellen toeneemt en het ontstaan van uitzaaiingen wordt geremd met name door activering van o.a. CTL en NK cellen. Wij hebben eerder aangetoond dat het aantal circulerende iNKT cellen in het perifere bloed verlaagd is in patiënten met kanker. Daarnaast hebben wij ook in een groep van patiënten met hoofd-hals tumoren, die met radiotherapie worden behandeld, aangetoond dat patiënten met een relatief laag aantal circulerende iNKT cellen een slechtere prognose hebben dan patiënten met een relatief hoog aantal circulerende iNKT cellen. Deze data suggereren dat kankerpatiënten baat zouden kunnen hebben bij behandeling die er op gericht is het aantal circulerende iNKT te verhogen. Echter, anders dan bij de muis, is bij de mens is gebleken dat toediening van vrij  $\alpha$ -GalCer leidt tot een tijdelijke afname van NKT cellen. Activering van het immuunsysteem werd alleen gezien als het aantal iNKT cellen voor behandeling relatief hoog was. In tegenstelling tot de behandeling met vrij  $\alpha$ -GalCer, had de behandeling met DC beladen met  $\alpha$ -GalCer wel effect: het aantal circulerende iNKT cellen nam toe. Een alternatieve methode om de aantallen circulerende iNKT cellen te verhogen is door middel van toediening van iNKT cellen van de patiënt, welke in het laboratorium vermeerderd zijn met behulp van bepaalde kweektechnieken.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gericht op het analyseren van de effectiviteit van geactiveerde iNKT cellen in de antitumor immuunreactie. Hiertoe hebben wij in deel 1 de effecten onderzocht op NK cel en/of CTL: na iNKT cel activering door middel van een aantal bekende immuun potentierende reagentia (TLR liganden) en na toevoegen van gekweekte humane iNKT cellen. In dit deel van het onderzoek hebben wij gebruik gemaakt van perifere witte bloed cellen van voornamelijk gezonde donoren. In deel 2 hebben wij in een muizenmodel onderzocht of de toediening van gekweekte iNKT cellen ook daadwerkelijk leidt tot verminderde uitgroei van tumoren.

Uit onze resultaten beschreven in deel 1 is gebleken dat bepaalde TLR liganden in staat waren iNKT cellen indirect te activeren, waarna de actieve iNKT cellen vervolgens in staat waren DC te activeren. Deze DC activering is noodzakelijk voor het opwekken van effectieve CTL. Vervolgens hebben wij aangetoond dat TAA specifieke CTL met veel grotere efficiëntie geïnduceerd kunnen worden door TAA beladen DC wanneer gekweekte iNKT cellen werden toegevoegd. Dit effect was afhankelijk van de aanwezigheid van het iNKT cel activerende ligand  $\alpha$ -GalCer op de DC. Een vergelijkbaar effect werd geobserveerd met betrekking tot NK cel activiteit. Gekweekte iNKT cellen induceerden een toegenomen functionele activiteit van NK cellen. Deze bleken na een kortdurende incubatie in de aanwezigheid van iNKT cellen en  $\alpha$ -GalCer beter in staat tumorcellen te doden, zowel via de directe methode alsook via monoklonale antistoffen.

In deel 2 beschrijven wij een methode voor het langdurig kweken van muizen iNKT cellen. Deze chronisch gestimuleerde iNKT cellen bleken dezelfde karakteristieken te hebben als hen direct vers geïsoleerde tegenhangers. Vervolgens hebben bij 4 verschillende batches van iNKT cellen getest met betrekking tot antitumor effectiviteit *in vivo*. Onze resultaten tonen aan dat gekweekte iNKT cellen inderdaad in staat zijn tumorgroei te remmen en in het model dat wij hebben bestudeerd deden zij dat met name via NK cel activering.

Concluderend: toediening van gekweekte iNKT cellen bij kanker patiënten is een potentieel effectieve manier om het immuunsysteem te activeren. Combinatie met  $\alpha$ -GalCer en TAA beladen DC vaccinatie zal de effectiviteit nog verder verhogen en leiden tot een sterke CTL en NK cel gemedieerde antitumor afweer reactie. De resultaten van dit onderzoek wijzen op nieuwe methodes om de aspecifieke afweer (“innate immunity”) in te zetten om de specifieke afweer (“adaptive immunity”) tegen tumoren te versterken.