

Nederlandse samenvatting

Kanker bestaat uit een groot aantal cellen met een verschillende genetische en fenotypische eigenschappen. De cellen vermenigvuldigen zich snel en er komen steeds nieuwe DNA mutaties bij doordat de tumor omgeving cellen selecteert met een gunstigere set eigenschappen voor overleving. Als kanker cellen zich verspreiden over het lichaam zijn er nieuwe omgevingsfactoren waardoor er weer andere kanker cellen overleven. De diversiteit aan kanker cellen binnen een patient heet tumor heterogeniteit.

Tumor heterogeniteit is de grootste oorzaak van kanker therapie falen. In **hoofdstuk 2** hebben we een muismodel van tumor heterogeniteit ontwikkeld om de invloed van tumor heterogeniteit op therapie resistentie te bestuderen. Hiervoor hebben we klonale kanker cellijnen uit een alvleesklier tumor gegenereerd van een transgene *LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}; P48-Cre* (KPC) muis die alvleesklier kanker ontwikkeld heeft. We hebben ontdekt dat deze klonale cellijnen in cel kweek elk een unieke set aan DNA mutaties hebben, verschillende groeisnelheden vertonen en verschillend reageren op kanker medicijnen.

De innovatie in onze studie ligt in het feit dat we de klonale cellen weer bij elkaar kunnen mengen en in de heterogene groep kunnen volgen door hun unieke DNA mutaties te meten met next generation sequencing. De klonale cellijnen reageren verschillend op een medicijn dat de belangrijke kanker-geassocieerde MEK pathway remt. Maar als de klonale cellijnen samen bij elkaar groeien, verandert de gevoeligheid van de klonale cellen voor de MEK remmer. Dit betekent dat de kanker cellen signalen met elkaar uitwisselen waardoor ze anders reageren op medicijnen. Daarom is het belangrijk dat medicijn screenings uitgevoerd worden op mengsels van verschillende kanker cellen, zodat een tumor beter wordt nagebootst.

Als we de klonale cellijnen gemengde tumoren laten vormen in de omgeving van fibrotisch bindweefsel en een intact immuun systeem in syngenetische muizen, vinden we dat de klonale cellijnen niet even snel groeien. Bovendien reageren de klonale cellijnen heel anders op de kanker medicijnen in vergelijking met de resultaten in celkweek. Dit betekent dat de tumoromgeving de gevoeligheid van kankercellen op medicijnen beïnvloedt en we de resultaten van medicijn respons in celkweek niet goed kunnen vertalen naar de resultaten in een levend organisme.

Op immuun therapie reageren de klonale cellijnen heel verschillend, ondanks dat ze allemaal uit dezelfde ene tumor afkomstig zijn. We ontdekten dat er een klonale cellijn is die heel gevoelig is voor een anti-PD-1 medicijn en deze cellijn is ook beter in staat om T-lymphocyten te activeren in vergelijking met de andere klonale cellen. Hiervoor hebben we T-lymphocyten geïsoleerd uit de blinde darmen van muizen met kanker. Wij zijn de eerste onderzoekers die hebben waargenomen dat de blinde darm van muizen met kanker

tumor-reactieve T-cellen bevat. Dit gaan wij ook onderzoeken in patienten met inoperabele alvleesklier kanker om zo betere immuun therapie opties te ontwikkelen. Samengevat kunnen we door ons muismodel belangrijke inzichten vergaren op het gebied van kanker medicijn resistentie en de effectiviteit van immuun therapie.

In **hoofdstuk 3** bestuderen wij de mutaties in circulerend DNA van patienten met alvleesklier en dikke darm kanker. Door middel van next generation sequencing van plasma DNA vergelijken we de mutaties ten tijde van de diagnose met de mutaties ten tijde van uitgezaaide ziekte. Zo kunnen we de evolutie van de kankercellen bestuderen. Bovendien hebben we de mutaties in het circulerende DNA ten tijde van de diagnose vergeleken met de mutaties in de tumor weefsels zelf. We hebben ontdekt dat slechts een deel van de tumor mutaties in het bloed gemeten konden worden. Dit kan zijn doordat in een vroeg kanker stadium de kanker mutaties in het bloed te sterk verdund zijn en dat met de huidige sequencing technieken deze nog niet meetbaar zijn. Daarnaast werden er in het bloed ook een groot percentage mutaties gemeten die in de tumor niet meetbaar waren. Dit betekent dat het kleine tumor weefsel niet voldoende de gehele kanker populatie kan representeren. Ook kan het zijn dat er al kleine uitzaaiingen elders in het lichaam aanwezig waren. Vervolgens hebben we de circulerende DNA mutaties vergeleken ten tijde van de diagnose met die van de uitgezaaide ziekte. Hieruit bleek dat er een flink percentage nieuwe mutaties zijn ontstaan en er ook sommige mutaties zijn verloren. We kunnen hieruit concluderen dat kanker constant veranderd en dat het bepalen van een behandelings strategie gebaseerd op een enkele tumor biopsie niet goed van toepassing is op uitgezaaide kanker. Bovendien weerspiegelt circulerend DNA de tumor heterogeniteit beter dan een het DNA van een weefsel biopsie.

MicroRNAs (miRs) zijn korte strengen genetisch materiaal die door cellen kunnen worden uitgescheiden om vervolgens gen expressie te beïnvloeden in andere cellen. MiRs in het bloed zijn met name afkomstig van endotheel, bloed en immuun cellen. Veranderingen in hoeveelheden van circulerende miRs kunnen verstoringen in het lichaam weergeven en daarom zijn circulerende miRs goede kanker biomarker kandidaten. In **hoofdstuk 4** hebben we de circulerende miRs bestudeerd in het bloed van patienten met alvleesklier kanker voor en na operatie. Het doel van de studie was om te onderzoeken of specifieke circulerende miRs geassocieerd zijn met progressieve ziekte. Daarnaast hebben we in het KPC muismodel van alvleesklier kanker serum miRs vergeleken in muizen met voorstadium van kanker en in muizen met uitgezaaide ziekte. Het bleek dat serum miR-125b-5p en miR-99a-5p geassocieerd zijn met progressie van alvleesklier kanker in zowel muizen als patienten. Vervolgens hebben we onderzocht in welke cellen deze miRs tot expressie komen in de patienten tumoren door middel van in situ hybridizatie. We vonden dat er enkele ontstekings cellen in het bindweefsel van de tumoren zijn die deze miR-125b-5p en

miR-99a-5p tot expressie brengen. In het specifiek, zijn de miR-positieve cellen in nauw verband met B-lymfocyten zichtbaar. Uit ons onderzoek blijkt dat er specifieke circulerende miRs geassocieerd zijn met progressieve alvleesklierkanker en dat deze afkomstig zijn van immuun cellen. Nader onderzoek moet uitwijzen welke immuun cellen dit zijn en in welk stadium van activering de miR-positieve zich bevinden.

In **hoofdstuk 5** onderzochten wij of circulerende miRs de effectiviteit van een multi-kinase remmer kunnen aantonen in patienten met uitgezaaide borstkanker. Dovitinib remt zowel FGFR als VEGF, belangrijke eiwitten in de vorming van bloedvaten en tumor bindweefsel. Wij onderzochten of veranderingen in plasma miRs konden aantonen of dovitinib een effectieve remming geeft op de groei van borstkanker tumoren. Hiervoor onderzochten wij de expressie van miRs in het bloed van patienten voor en na gebruik van dovitinib. We vonden dat expressie van 6 miRs patienten konden scheiden op basis van hun respons op de therapie. Hieruit concluderen we dat circulerende miRs potentiële biomarkers zijn voor de effectiviteit van kanker medicijnen.

Deze dissertatie bevat wetenschappelijke onderbouwingen voor de implementatie van circulerende biomarker analyses in de klinische zorg van patienten met kanker. Tot op heden worden tumor weefsels gebruikt om de moleculaire eigenschappen van kanker te onderzoeken. Kanker is een dynamische, heterogene ziekte die continue verandert onder de druk van omgevingsfactoren in het tumor weefsel en anti-kanker behandelingen. Kanker cellen in uitzaaiingen bevatten andere genetische en fenotypische kenmerken dan de cellen in de primaire tumor. Om deze ziekte beter te bestuderen is het nodig om genetisch materiaal in herhaalde bloed monsters te analyseren. Circulerend DNA kan het genetische landschap van de kankercellen in het hele lichaam bloot geven en circulerende miRs lenen zich voor het onderzoeken van de staat van het lichaam in reactie op de kanker cellen. Door middel van de bovengenoemde circulerende biomarkers kunnen we betere inzichten verkrijgen in het ontstaan van kanker progressie en in het verbeteren van therapie.