

VU Research Portal

Role of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor inhibition in the cytotoxicity of fluoropyrimidines

Temmink, O.H.

2007

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Temmink, O. H. (2007). *Role of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor inhibition in the cytotoxicity of fluoropyrimidines.*

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl



Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

Kanker

Kanker is een genetische aandoening waarbij beschadigingen in het DNA, ook wel mutaties genoemd, centraal staan. Deze kunnen zowel erfelijke mutaties als wel verworven mutaties (geïnduceerd door infecties, fysische factoren en/of chemische stoffen) zijn. Deze mutaties kunnen over een langere periode accumuleren in het DNA totdat er een som van beschadigingen is ontstaan die kan leiden tot kanker. Om daadwerkelijk kanker te krijgen moeten de mutaties optreden in genen die betrokken zijn bij het reguleren en controleren van de celdeling. Verschillende genen spelen daarbij een rol, zoals tumoronderdrukkende genen (tegengaan van ongeremde celdelingen), tumorbevorderende genen (stimuleren van normale celdelingen) en DNA-reparatiegenen (herstellen mutaties).

Cellen in het menselijk lichaam groeien normaalgesproken gecontroleerd. Zowel celdeling en celdood zijn processen die nodig zijn voor het normaal functioneren van weefsels. Een verstoring van de balans van deze twee processen, ongecontroleerde celdeling en/of het niet langer doodgaan van cellen, kan leiden tot een tumor, waarbij cellen zich persistent ongecontroleerd vermenigvuldigen. Tumoren worden gekenmerkt door een aantal karakteristieke eigenschappen waarin ze zich onderscheiden van normale cellen: ze zorgen zelf voor groeisignalen of zijn hiervan onafhankelijk, ze zijn minder gevoelig voor groeiremmende signalen, ze omzeilen geprogrammeerde celdood, ze vertonen ongelimiteerde celdeling, ze induceren nieuwe bloedvaten (angiogenese), ze kunnen zich uitbreiden naar omliggende weefsels (invasie) en ze kunnen zich verspreiden naar andere plaatsen in het lichaam (metastasering ofwel uitzaaiing).

Bij kanker (en sommige andere ziektes) speelt angiogenese een belangrijke rol. Angiogenese is het ontstaan van nieuwe bloedvaten uit het bestaande vaatbed. Een tumor kan op een gegeven moment maar beperkt groeien, omdat bestaande vaten maar een beperkte hoeveelheid voedingsstoffen en zuurstof kunnen aanvoeren (en afval afvoeren). Om een gebrek aan deze stoffen te voorkomen zorgt de tumor voor (verhoogde) productie van pro-angiogene factoren, die het aanmaken van nieuwe bloedvaten uit de bestaande bloedvaten bevorderen, opdat de tumor

verzekerd is van voldoende aanvoer van voedingsstoffen en zuurstof voor verdere groei.

Behandeling van dikke darmkanker (chemotherapie)

In Nederland worden jaarlijks bijna 10.000 mensen met de diagnose dikke darmkanker geconfronteerd, en elk jaar sterven zo'n 4.500 mensen aan deze ziekte. Men schat dat wereldwijd ongeveer 400.000 mensen sterven aan de gevolgen van dikke darmkanker. In veruit de meeste gevallen (~75%) ligt een niet-erfelijke (leefomgevingsfactoren) oorzaak er aan ten grondslag. De prognose is gerelateerd aan drie karakteristieken: mate van penetratie van de tumor in de darmwand, aangetaste lymfeklieren en de aanwezigheid van metastasen. De meest toegepaste en efficiënte behandelingsmethode voor dikke darmkanker is chirurgie, het wegsnijden van de tumor. Twee andere methoden zijn het bestralen van de tumor (radiotherapie) of het geven van anti-kanker middelen (chemotherapeutica). Tegenwoordig wordt ook vaak een combinatie van twee van de drie of alle drie toegepast.

Op drie verschillende experimentele niveaus kan de werking en activiteit van anti-kankermiddelen onderzocht worden. Ten eerste het 'in vitro' onderzoeksniveau, waarbij experimenten gedaan worden met behulp van biologische technieken die buiten het lichaam van het organisme worden toegepast. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een deel van het organisme (bv. weefsels), afzonderlijke cellen of organische stoffen die in oplossing gebracht zijn. In dit proefschrift zijn de meeste beschreven experimenten 'in vitro' uitgevoerd. Middelen die 'in vitro' goed blijken te werken worden daarna meestal op proefdieren getest. Proefdieronderzoek ligt op het 'in vivo' onderzoeksniveau. 'In vivo' experimenten worden gedaan met behulp van biologische technieken die in het complete levende lichaam van een organisme worden toegepast. Een goed voorbeeld hiervan is het implanteren van tumorstukjes in muizen, die vervolgens behandeld worden met (een) anti-kankermiddel(en), waarna men kan kijken wat de beste toedieningsmethode is en/of het actieve middel de tumor bereikt en de tumorgroei goed geremd is. Middelen die 'in vivo' ook goed blijken te werken worden daarna op patiënten (en gezonde mensen) getest middels klinische studies, oftewel het derde onderzoeksniveau. Hierbij wordt bekeken hoeveel

van een middel aan de patiënt gegeven kan worden (bijwerkingen/toxiciteit), hoe actief het middel tegen verschillende tumortypes is en om te kijken of het nieuwe middel beter werkt dan het standaard gebruikte middel. Dit gehele proces van ontwikkeling van een anti-kankermiddel tot aan het goedgekeurde standaard gebruik voor behandeling van kankerpatiënten is erg kostbaar en kan soms wel langer dan 10 jaar duren.

Een selecte groep anti-kankermiddelen, die onder andere veel gebruikt worden in de behandeling van dikke darmkanker, zijn de fluoropyrimidines. Deze fluoropyrimidines, zoals 5-fluorouracil (5FU), 5'-deoxyfluorouridine (5'DFUR) en trifluorothymidine (TFT), hebben een structuur die lijkt op de normale bouwstenen van het DNA, maar hebben echter een kleine modificatie ondergaan door toevoeging van één of enkele fluorgroepen. Fluoropyrimidines volgen de normale metabole (stofwisselings) routes die de natuurlijke bouwstenen van het DNA (en diens verwante RNA) ook zouden volgen, maar door de fluorgroep kunnen ze deze routes verstoren en/of worden uiteindelijk ingebouwd in het DNA of RNA. De verstoring van de metabole routes voor de bouwstenen van het DNA en het inbouwen in DNA of RNA heeft tot gevolg dat in de cel op vele niveaus schade, waaronder DNA breuken en andere mutaties, ontstaat, met het gevolg dat de cel uiteindelijk doodgaat.

Inhoud van dit proefschrift

In dit proefschrift is gekeken naar de werkingsmechanismen van de nieuwe orale anti-kankerformulering TAS-102 (ontwikkelt door Taiho Pharmaceuticals, Japan), dat bestaat uit de fluoropyrimidine TFT en de potente specifieke remmer van het eiwit "thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor" (hierna "TP" genoemd) TPI (thymidine phosphorylase inhibitor). Naast TFT is ook de rol van TP-remming in de cytotoxiciteit van andere fluoropyrimidines onderzocht. TP is een enzym (katalysator van metabole reacties) dat werkzaam is in het pyrimidinemetabolisme. Pyrimidines, waarvan de nucleoside thymidine (TdR) er één is, worden geïncorporeert in het DNA. TFT is TdR, maar dan met een fluorgroep er aan toegevoegd. TP kan TdR afbreken in twee stukken (fosforolyseren), de base thymine en de suikergroep deoxyribose-1-fosfaat (dR-1-P).

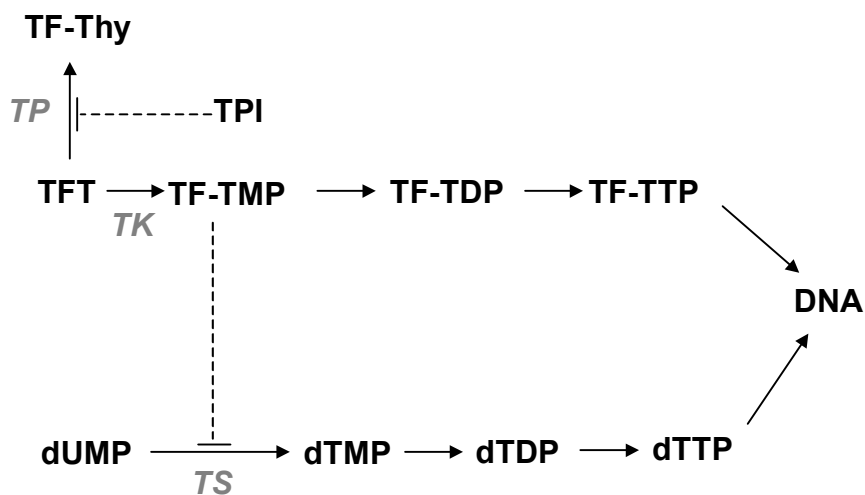
Veel studies hebben aangetoond dat TP verhoogd tot expressie kan komen in veel verschillende tumoren, waaronder dikke darmkankertumoren. Aanvullend speelt het enzym een rol bij de angiogenese, en is zodoende te associëren met vaatdichtheid. Dit kan het vormen van metastasen bevorderen. Kortgezegd, veel TP in de tumor zorgt voor een slechtere afloop voor de patiënt. Het mechanisme achter dit pro-angiogene effect is echter niet geheel duidelijk.

Naast de pro-angiogene rol is er belangstelling voor TP, omdat het naast het natuurlijke substraat TdR ook andere stoffen met een vergelijkbare chemische structuur kan omzetten. TP is daardoor in staat om sommige van de reeds beschreven fluoropyrimidines te activeren of te inactiveren, waaronder de TdR-analoga TFT en 5'DFUR. TP kan binnen de anti-kankertherapie op meerdere manieren gebruikt worden: TP-remming om het angiogene effect tegen te gaan, TP-remming om de inactivatie van anti-kankermiddelen te voorkomen, gebruik maken van de hoge TP-activiteit in de tumor om daar selectief anti-kankermiddelen mee te activeren. De TAS-102 formulering maakt in principe gebruik van de eerste 2 manieren. De eerste klinische studies waarbij TFT als enkel chemotherapeutikum werd getest werden al snel gediscussieerd, omdat TFT in vivo te snel wordt afgebroken. TAS-102 is dan ook speciaal ontwikkeld om de anti-tumoractiviteit van TFT te verhogen, waarbij TPI deze duale rol vervult door middel van diens anti-angiogene effecten en door de beschikbaarheid van TFT in het lichaam (bloedplasma) te verhogen door de afbraak van TFT te remmen. TAS-102 wordt op dit moment getest in de kliniek tegen verscheidene gastrointestinale maligniteiten (samengevat in **Hoofdstuk 2**), en om die reden zijn darmkankercellijnen het meeste gebruikt in de studies beschreven in dit proefschrift.

TFT metabolisme

Om de anti-tumoractiviteit van TAS-102 in vitro te onderzoeken is gekeken naar de rol van TFT en/of TPI hierin, daarbij kijkend naar het effect van/op de enzymen die direct een rol spelen in het TdR/TFT metabolisme (zie Figuur 1). In **Hoofdstukken 3, 4 en 11** wordt de rol van (de mate van expressie van) deze enzymen op de cytotoxiciteit van TFT en de aangrijpingspunten (targets) van TFT besproken. Om de limiterende factoren in TFT cytotoxiciteit te kunnen bepalen zijn

kankercellijnen met verschillende cellulaire eigenschappen gebruikt. (Kanker)cellen met ofwel een verhoogde of verlaagde (of afwezige) expressie/activiteit van de betrokken enzymen zijn gebruikt. Deze cellen werden in vitro aan TFT en 5FU, dat in tegenstelling tot TFT door TP wordt geactiveerd, in verschillende concentraties en tijden blootgesteld om vervolgens de gevoeligheid te meten in de aan- en afwezigheid van TPI. Onverwacht werd geconstateerd dat ondanks de hoge afbraak van TFT, Colo320TP1 cellen met zeer hoge TP activiteit niet minder gevoelig (resistent) zijn tegen TFT, terwijl TPI de TFT gevoeligheid bij langdurige blootstelling niet verhoogde. In eerste instantie verwachtten we verlaagde IC_{50} waarden



Figuur 1. Werkingsmechanisme van TFT. *TP* = thymidine phosphorylase (breekt TFT af), *TK* = thymidine kinase (zet TFT om in zijn actieve vorm), *TS* = thymidylate synthase (wordt geremd door de actieve vorm van TFT). TFT vormt tezamen met TPI de formulering TAS-102.

(concentraties die 50% groeiremming veroorzaken) te zien, aangezien eerder is bewezen dat TFT een uitstekend substraat is voor TP. Om dit te verklaren werd getracht de maximale activatie van TFT te voorkomen door de blootstellingstijd te verkorten tot 4 uur gevolgd door het kweken van de cellen in TFT-vrij medium. In deze situatie bleef de TFT gevoeligheid onveranderd bij cellen met verhoogd TP of wanneer TPI aan het medium werd toegevoegd. Dit was ook een onverwachte waarneming vergeleken met in vivo experimenten waarbij gebruik werd gemaakt van tumorimplantaten in dieren (m.n. muizen). Het is al aangetoond dat in vivo TPI de TFT-activiteit kan verhogen door te voorkomen dat TFT grootschalig wordt

afgebroken door bv. levercellen, die een hoge TP expressie hebben, hetgeen een verhoogde TFT anti-tumoractiviteit bewerkstelligt. Oftewel, in vitro hoeft TPI niet per sé toegevoegd te worden om verhoogde TFT-cytotoxiciteit te verkrijgen.

Een snelle opname and activatie van TFT hebben we in menig experiment waargenomen, maar ondanks een hoge mate van afbraak van TFT, is de activatie van TFT voldoende om het targetenzym thymidylate synthase (TS) te remmen en om te worden geïncorporeerd in het DNA, alhoewel de bijdrage van elk effect afhankelijk is van de blootstellingstijd. Hierbij stimuleert TS-remming de TFT-incorporatie, omdat minder van de natuurlijke TdR-bouwstenen in het DNA geïncorporeerd worden. TPI was echter alleen in staat de TFT-cytotoxiciteit te beïnvloeden in cellen met zeer hoge TP na korte blootstelling. Aanvullend leidde TP-remming door TPI tot verhoogde aanmaak van actieve TFT-metabolieten (x2) in de Colo320TP1 cellen, maar dit was niet direkt gerelateerd aan verhoogde TFT incorporatie in het DNA. Andere onderzoekers hebben al eerder aangetoond dat meer TFT in het DNA van tumorcellen wordt geïncorporeerd na herhaaldelijke kortstondige blootstelling aan TFT, hetgeen nog kan worden bevorderd met TPI. TFT heeft net als veel TdR analoga een hoge affiniteit voor thymidine kinase (TK), dat TFT omzet in zijn actieve vorm, en wellicht wel meer dan voor TP, resulterend in een zeer snelle omzetting van TFT in zijn actieve metabolieten om zodoende de TFT-degradatie door TP teniet te doen. Dit verklaart tevens het verminderde effect van TPI in vitro. Bovendien is de tumorrespons op TAS-102 onafhankelijk van de expressie van TP zelve, terwijl de TK/TP ratio wel gecorreleerd is aan de remming van de tumorgroei. Dit suggereert dat naast de systemische aanwezigheid van TPI zowel de balans van activatie en degradatie van TFT in tumorcellen een significante rol speelt in de TFT-geïnduceerde anti-tumoractiviteit.

Al is incorporatie in het DNA een belangrijke factor in de in vitro cytotoxiciteit van TFT in darmkankercellen, TFT is ook in staat om TS te remmen in cellen met verhoogde TS-expressie. Deze cellen zijn gevoeliger voor TFT dan 5FU (~4x) en zijn kruisresistent tegen TFT in vergelijking met 5FU. Dit verschil is sterker bij korte blootstellingen aan de drugs (>3x bij een 4-uurs blootstelling). De omzetting van TFT in zijn actieve vorm door TK is essentieel, en omdat er maar één omzettingsstap voor nodig is, is de cytotoxische uitwerking van TFT al binnen enkele uren waarneembaar,

dit in tegenstelling tot 5FU dat meerdere omzettingstappen nodig heeft om actief te worden in tumorcellen (**Hoofdstuk 4**). Wanneer cellen niet meer blootgesteld worden aan TFT zal na verloop van tijd de TS-activiteit in cellen zich herstellen, hetgeen aangeeft dat continue blootstelling nodig is om TS te remmen (reversibele remming). Daarom zal bij lange (herhaaldelijke) blootstelling aan TFT de mogelijke resistentie door (verhoogde) TS-activiteit kunnen worden omzeild, hetgeen tezamen met de incorporatie van TFT in het DNA voor maximale antitumoreffecten zorgt.

Naast de rol van TS als celdelingsfactor in tumorgenese wordt TS-expressie beschouwd als zijnde een belangrijke prognostische factor in 5FU-bevattende chemotherapie voor dikke darmkankerpatiënten. Daarentegen is van de relatie van TS met andere prognostische factoren (bv. tumorsuppressoreiwitten) weinig bekend. Onderzoek heeft uitgewezen dat patiënten met tumoren met lage TS-activiteit/eiwitspiegels beter reageren op chemotherapie gebaseerd op TS-remming. Onze resultaten (**Hoofdstuk 3**) laten zien dat 5FU-resistente H630R10 humane darmkankercellen met verhoogd TS TFT en 5FU een 30-40-voudige toename in IC_{50} -waarden kunnen induceren in vergelijking met dezelfde cellen (H630) die een lage TS hebben. Dit geeft aan dat TS-activiteit een zeer belangrijke rol speelt in de effectiviteit van deze TS-remmers, waarbij tegelijkertijd kruisresistentie tegen andere TS-remmers, zoals antifolaten, die TS op een ietwat andere manier remmen. Naast verhoogd TS spelen waarschijnlijk andere factoren ook een rol in TFT-resistentie. Om dat te onderzoeken hebben we H630-cellen resistent gemaakt tegen TFT (d.m.v. selectie op basis van stapsgewijze concentratieverhogingen), resulterend in een variant (H630-cTFT) die ongeremd doorgroeit in de aanwezigheid van TFT (20 μ M TFT) en een variant (H630-4TFT) die 4 uur per week aan een hoge concentratie TFT (250 μ M TFT) wordt blootgesteld, maar daarbij ook ongeremd doorgroeit (**Hoofdstuk 11**). Deze cellen zijn 200x of meer ongevoeliger geworden voor TFT. Beide cellijnen zijn kruisresistent tegen FdUrd, een 5FU-metaboliet dat door TK geactiveerd wordt, maar niet tegen 5FU of diens alternatieve inactieve voorloperverbinding (=prodrug) 5'DFUR, die beide door TP geactiveerd worden. Aanvullende analyses onthulden dat de TP-activiteit en TS-expressie ongewijzigd bleven in beide cellijnen. De totale TK-activiteit was wel significant lager in de H630-4TFT cellen (>90%). Een andere onderzoeksgroep heeft al eerder aangetoond dat

5FU-resistente DLD-1 darmkankercellen niet kruisresistent zijn tegen TFT, maar wel een verlaagde activiteit hadden van het belangrijke 5FU-activerende enzym orotaatfosforibosyltransferase, hetgeen aangeeft dat 5FU-resistente cellen niet per sé kruisresistent hoeven te zijn tegen TFT. Hierbij kan de conclusie getrokken worden dat, naast verhoogd TS, verlaagde TFT-activatie door TK waarschijnlijk een ander belangrijk mechanisme is voor TFT-resistentie. Aan de andere kant is de waarneming dat geen verlaagde TK-activiteit is waargenomen in de H630-cTFT cellen verrassend te noemen, implicerend dat de expressie of activiteit van enzymen direct betrokken in het TFT-metabolisme niet per sé geassocieerd dienen te worden met TFT-resistentie. Verdere analyse wees uit dat in deze cellen waarschijnlijk een disregulatie is opgetreden in het fosfolipidemetabolisme, en daarmee in de prostaglandineproductie in cellen, oftewel een verstoorde signaaltransductie. Onze data suggereert een zekere relatie tussen het fosfolipidemetabolisme en fluoropyrimidine-resistentie, alhoewel het exacte mechanisme dat hieraan ten grondslag ligt nog verder onderzocht dient te worden.

Rol van TP expressie in fluoropyrimidinegevoeligheid

TP heeft door zijn brede substraatspecificiteit de mogelijkheid om verscheidene fluoropyrimidines te klieven, waardoor het bepaalde anti-kankermiddelen die momenteel in de kliniek gebruikt worden (zoals 5'DFUR) of waar nog onderzoek naar wordt gedaan kan (in)activeren. TP kan door allerlei lichaamseigen stoffen opgeregeerd worden, maar ook door sommige chemotherapeutica. Sommige onderzoekers beweren echter dat dit met name afhankelijk is van de intrinsieke TP-expressie van cellen, dat beïnvloed kan worden door de aanwezigheid van chemotherapeutische agentia. Dit is minder relevant voor TAS-102, omdat TP direct geïnactiveerd wordt door TPI, maar voor andere fluoropyrimidines kan het zeker een rol spelen in de bestrijding van tumoren middels deze drugs. Onze groep heeft eerder bekeken of blootstelling van darmkankercellen aan TFT of 5'DFUR de expressie van TP kan beïnvloeden, waar uit de resultaten bleek dat verschillende effecten op het TP-eiwit en TP-mRNA (DNA-afschrijvingsmateriaal/code om een eiwit te kunnen vormen) kunnen worden geïnduceerd door deze drugs. Dit was niet uniform in verschillende cellijnen die toendertijd gebruikt zijn, en de uiteindelijke TP-

activiteit bleef hierbij ongewijzigd. TPI kon de TP-activiteit volledig of grotendeels remmen in deze cellijnen, waarbij na verwijdering van TPI de TP-activiteit niet of nauwelijks herstelde, leidend tot de conclusie dat TPI aan het enzym gebonden is en daardoor de remming van TP effectief kan continueren, hetgeen een potentieel additief effect is van TPI bij de TAS-102 formulering.

De hierboven genoemde resultaten laten zien dat regulatie van TP drug- en cellijnafhankelijk is en (deels) gerelateerd is aan de intrinsieke metabole eigenschappen van cellen, die mogelijk beïnvloed kunnen worden in tumorcellen. Aanvullend, een lage TP expressie kan voor resistentie tegen bepaalde fluoropyrimidine-gebaseerde anti-kankeragentia zorgen. Een goed voorbeeld hierbij is de orale 5FU-prodrug capecitabine, dat door TP geactiveerd dient te worden en daardoor afhankelijk is van voldoende TP in en rondom de tumor. Dit geldt niet voor TAS-102, omdat we al geconstateerd hebben dat het effectief is tegen tumoren met verschillende TP-expressielevels (**Hoofdstuk 5**). Dit is gedaan met de zogenoemde Hollow Fiber Assay, dat een efficiënte methode is voor drugscreening, maar ook een uitstekende in vivo manier is om diverse farmacodynamische (de uitwerking van een stof op het lichaam/weefsels/cellen) parameters na korte blootstelling aan fluoropyrimidines te onderzoeken. We hebben aangetoond dat de rol van TP essentieel is in de activiteit van of de resistentie tegen vercheidene orale fluoropyrimidinebevattende anti-kankerformuleringen, daarbij gebruik makend van TP-deficiënte Colo320 darmkankercellen en Colo320-TP1 met verhoogd TP uitgetest op muizen. Na analyse bleek dat TAS-102 aanzienlijke groeiremming kan induceren bij beide cellijnen, en dat deze remming geneutraliseerd wordt bij afwezigheid van TPI. Dit resultaat was terug te vinden in enkele farmacodynamische evaluaties, waaronder het stopzetten van de voortgang van de celcyclus (cel deelt niet meer) en toename van apoptose (cellulaire zelfmoord) als gevolg van DNA-schade, dat groter was in Colo320 dan Colo320TP1. In tegenstelling tot TAS-102 kan het toevoegen van TPI de effecten van 5'DFUR-geïnduceerde cytotoxiciteit en apoptose reduceren bij Colo320-TP1, maar niet volledig. Kortom, voor 5'DFUR (en capecitabine) moet er TP aanwezig zijn om enige cytotoxiciteit uit te kunnen oefenen, terwijl TAS-102 niet direct gerelateerd is aan de TP-levels in/bij de tumor, maar daarentegen alleen cytotoxisch kan zijn wanneer systemisch TPI aanwezig is. Oftewel, om genoeg

geactiveerd TFT bij de tumor(en) te kijken is TPI de grote determinant, en TK is hierbij secundair, want geen TFT betekent geen TFT-activatie en dus geen cytotoxisch effect. Een bijkomend aspect is dat TPI ook de TdR-concentraties in het plasma kan verhogen, opdat de TFT-afbraak verlaagd wordt omdat TdR kan concurreren met TFT in de door TP-gemedieerde fosforolyse.

TP vs UP in fluoropyrimidinegevoeligheid en angiogenese

Een hoge TP-expressie in tumoren kan theoretisch TFT inactiveren (met of zonder TPI), maar onze resultaten laten zien dat dat lang niet altijd het geval is. Dit betekent dat voor in vivo en klinische toepassingen hoge TP levels in de tumor niet per sé een negatieve parameter hoeft te zijn, zoals TAS-102 dat ook effectief kan zijn tegen tumoren met hoge TP levels. Daarentegen is 5'DFUR selectief afhankelijk van TP, omdat TP betrokken is bij de activatie van 5'DFUR en analoga ervan. Onder andere om die reden worden de regulatiemechanismen van het enzym nog steeds onderzocht. TPI beschermt (tumor)cellen van 5'DFUR-geïnduceerde cytotoxiciteit, al is het maar deels gezien vanuit apoptotisch oogpunt. 5'DFUR is niet alleen afhankelijk van TP zoals oorspronkelijk gedacht werd, maar andere fosforolyse-enzymen, met name 'uridine phosphorylase' (UP), spelen ook een rol hierin. Het is algemeen aanvaard dat TP en UP expressies variëren in verschillende organen en weefsels en bij verschillende diersoorten, dat de variatie in hun substraatspecificiteit sterk benadrukt. Een interessante bevinding van onze onderzoeksgroep was dat in SW1398 en SW948 darmkankercellen TdR fosforolyse niet volledig geremd kan worden, of deels door TPI (40%), ondanks het feit dat deze cellen een vergelijkbare IC_{50} en enzymatische activiteit hebben vergeleken met cellen waarbij TPI de TP-activiteit 100% kan remmen met het gevolg dat TdR fosforolyse volledig geblokt wordt. Ons uitgangspunt was dan ook dat UP mogelijk een aanzienlijke rol speelt in de onvolledige omzetting van deze substraten door TP.

Het is bekend dat zowel TP als UP een brede en overlappende substraatspecificiteit hebben, maar in verscheidene studies wordt de rol van UP in fluoropyrimidinegevoeligheid onderschat. Om dit te verhelderen hebben we getracht de relative contributie van beide enzymen in de gevoeligheid voor 5FU en 5'DFUR te onderzoeken (**Hoofdstukken 6 en 7**). Om de enzymactiviteiten te moduleren zijn

TPI en de specifieke potente UP-remmer 5-benzylacetyluridine (BAU) gebruikt. In HaCaT keratinocyten (huidcellen) en witte bloedcellen zagen we dat TPI en BAU respectievelijk het meeste TdR en uridine (Urd, een analoog van TdR dat met name door UP wordt omgezet) afbreekt (>80%), maar dat beide enzymen een groot aandeel in de activatie van 5'DFUR kunnen hebben. In darmkankercellijnen overlappen deze 5'DFUR-omzettingen voor TP en UP, maar beide enzymen zijn verantwoordelijk voor een bepaalde hoeveelheid aan omzetting van de natuurlijke substraten TdR en Urd en de fluoropyrimidines 5FU en 5'DFUR, hetgeen wel verschilde per cellijn. Opvallend was dat in SW1398 cellen UP bijna geheel verantwoordelijk was voor de omzetting van TdR en 5'DFUR, maar niet in SW948, implicerend dat UP naast TP een minstens zo belangrijke rol kan spelen in de activatie van 5'DFUR in sommige gastrointestinale tumoren. Een tweede opmerkelijke observatie was dat na remming van beide enzymen er nog steeds substraat omzetting (>40%) experimenteel kon worden waargenomen in tumorcellen en normale cellen, suggererend dat TP een secundaire rol kan hebben in 5FU gevoeligheid. Dit was het sterkst in SW1398, waar omzetting van TdR, Urd en 5'DFUR (>20%) waargenomen werd na complete remming van beide enzymactiviteiten. Dit kan (deels) verklaard worden doordat 5FU ook via enkele andere metabole routes middels andere enzymen geactiveerd kan worden. UP was ook niet volledig verantwoordelijk voor de Urd-omzetting in SW948 cellen, waar mogelijk andere (onbekende) pyrimidinefosforylases een bijdrage in de omzetting leveren. Dit was ook te zien in de druggevoeligheidsexperimenten, waarbij Colo320 relatief ongevoelig bleek voor 5'DFUR in vergelijking met SW1398 en SW948, een resultaat dat opvallend genoemd kan worden, omdat geen TP-activiteit bij TdR-klieving werd geconstateerd. Bij diens variant Colo320-TP1 met verhoogd TP zagen we dat TP-remming door TPI alleen de IC_{50} van 5FU en 5'DFUR respectievelijk 11x en 50x verhoogde, hetgeen de secundaire rol van TP wederom benadrukt. Samenvattend valt te concluderen dat naast TP, UP een significante rol kan spelen in de activatie van fluoropyrimidines (zoals 5FU-prodrugs) in en bij de tumor, dat nog versterkt kan worden door de vaak geobserveerde opregulatie van deze enzymen in de tumor. Toekomstige studies zouden dan ook de contributie van UP mee moeten nemen in het onderzoek naar het intracellulaire metabolisme van 5'DFUR.

Naast het feit dat TP en UP belangrijke enzymatische intermediairen in (fluoro)-pyrimidinemetabolisme zijn, speelt TP ook een rol in de angiogenese, aangezien aangetoond is dat TP identiek is aan het pro-angiogene 'platelet-derived endothelial cell growth factor'. Menig studie heeft aangetoond dat verhoogd TP in de tumor en daar omheen (stroma) in een toename in de vaatdichtheid kan resulteren, dat voordelig is voor de tumor en dus nadelig voor de patiënt. Sommige onderzoeksgroepen hebben al aangetoond dat een verhoogde vaatdichtheid kan correleren met de formatie van metastasen in humane dikke darmkanker, alhoewel andere onderzoekers dit niet zien als een direkt gevolg van verhoogd TP. Het exacte mechanisme hierachter is echter onbekend, maar veel onderzoek hiernaar richt zich op de metaboliëten die ontstaan na TdR-afbraak, en dan met name de suiker dR-1-P en het secundaire produkt daarvan: dR. dR heeft pro-angiogene alsmede anti-apoptose eigenschappen, en wordt gezien als chemotactisch agens dat neo-vascularisatie (vormen van nieuwe bloedvaten) middels concentratiegradiënten kan induceren/bevorderen, omdat die dan cellen (endotheelcellen) richting de tumor kan aantrekken om vaten te gaan vormen. Angiogenese is dan ook een dynamisch proces dat gecontroleerd wordt door de aanwezigheid van diverse pro- en anti-angiogene factoren. Toch is er geen duidelijke consensus omtrent het associëren van verhoogd TP met het bevorderen van angiogenese in tumoren, aangezien er ook in vivo experimenten gedaan zijn waaruit bleek dat tumoren met veel TP niet een toegenomen neo-vascularisatie in de tumoren lieten zien.

TP is van nature hoog in bepaalde humane weefsels (o.a. darm, lever, blaas), maar wordt voornamelijk tot expressie gebracht door bepaalde immuuncellen, bloedplaatjes en endotheelcellen. Onze resultaten laten zien dat perifere witte bloedcellen in staat zijn om behoorlijke hoeveelheden TdR door TP af te kunnen laten breken in enkele uren, waarbij TP en UP de voorkeur hebben om respectievelijk TdR en Urd af te breken, maar beide 5'DFUR in 5FU kunnen omzetten (**Hoofdstuk 7**). Voor het eerst hebben we kunnen aantonen dat sommige immuuncellen zoals macrofagen (ruimen o.a. geïnfecteerde cellen op in het lichaam na herkenning) een hogere basale TP-activiteit (>4x) hebben dan de immuuncellen waar ze uit voortkomen, de ongedifferentieerde monocytën. Tumorinfiltrerende macrofagen hebben vaak een overexpressie van TP, dat naast de tumorcellen zelf, kunnen

bijdragen aan de hoge TP-levels in het stroma. Dit aandeel kan men relateren aan gestimuleerde angiogenese, waarbij de fluoropyrimidinegevoeligheid en de overlevingskans van de tumor rondom necrotische (afstervende) gebieden mogelijk kan worden beïnvloed. Om meer inzicht te krijgen in de effectiviteit (cytotoxiciteit) van TFT (of capecitabine/5'DFUR) is het wellicht belangrijk om TP levels in monocytën en/of bloedplaatjes te monitoren voor en gedurende de behandeling van kankerpatiënten met TAS-102, ook om de duur van TP-remming door TPI te kunnen observeren.

Het bestrijden van angiogenese als aanvulling op de huidige chemotherapie is een belangrijke relatief nieuwe ontwikkeling. TAS-102 is eigenlijk een combinatie van beide. We observeerden dat muizen met geïmplanteerde tumorcellen na 10 dagen behandeling met TAS-102 TPI al in staat is om vaatgroei bij de tumorcellen te reduceren, dat waarschijnlijk te relateren is aan suppressie van de invasiviteit van tumorcellen en metastasering. De capaciteit van TPI om deze processen in vivo te blokken is ook onderzocht door andere onderzoekers, die lieten zien dat bij darm- en longtumoren TPI TP-geïnduceerde neo-vascularisatie op een dosis-afhankelijke manier kan remmen in verschillende muizenmodellen, zowel waarbij tumoren TP hoog als laag tot expressie brachten. TPI alleen kan ook de groeisnelheid van cellen remmen en het apoptotische proces in gang zetten, alsmede de chemotactische motiliteit en de invasie van het basaalmembraan (protectieve weefsellaag dat moeilijk doordringbaar is voor migrerende cellen) door tumorcellen verlagen en daarbij de vorming van levermetastasen. De anti-tumoractiviteit van TPI als middel op zich en diens belangrijke rol in tumorgroei impliceren dat TP een belangrijke determinant is in de invasiviteit en inductie van metastasen bij solide tumoren met hoge TP-expressie. Door deze eigenschappen van TPI is TAS-102 een veelbelovende formulering voor gebruik in de kliniek. Daarom is het ook interessant om in de nabije toekomst TAS-102 te combineren met andere (nieuwe) middelen die vaatgroei tegengaan.

Drugcombinaties

Verschillende (pre)klinische studies hebben aangetoond dat tumorregressie vergroot kan worden door een anti-angiogeen middel te combineren met een

cytotoxisch anti-kankermiddel, hetgeen TAS-102 een uitstekende kandidaat maakt om te combineren met andere cytotoxische agentia. In dit proefschrift beschrijven we de combinatie van TAS-102 (als TFT) met andere cytotoxica. TFT is in vitro gecombineerd met andere TS-remmers (**Hoofdstuk 8**), oxaliplatin (OHP; **Hoofdstuk 9**) en irinotecan (CPT-11; **Hoofdstuk 10**) in verschillende blootstellingsschema's om de interactie tussen de drugs te kunnen bepalen. Het combineren van TFT met FdUrd, een 5FU metaboliet, is geen optie aangezien de effecten puur additief zijn door overlappende werkingsmechanismen. Bij lage concentraties van folaten (co-factoren die nodig zijn om TS te kunnen laten werken) vonden we dat TFT met de folaatremmers AG337, ZD1694 en GW1843 (groep der antifolaten) een lichte synergistische (elkaar versterkende) interactie in groeiremming in darmkankercellen kan aangaan. De laagfolaatstatus verhoogt waarschijnlijk de binding van antifolaten met TS, omdat al gevonden is dat folaatspiegels in medium en in cellen een belangrijke determinant is in de effectiviteit van antifolaten.

Een veruit groter synergistisch effect in darmkankercellen werd gevonden wanneer TFT is gecombineerd met het DNA-schadeproducerende OHP of SN38, de actieve metaboliet van CPT-11. OHP en SN38 maken het DNA rigider door binding van buitenaf, en niet zoals TFT, dat geïncorporeerd wordt in het DNA zodat het moeilijk ontvouwt bij celdeling en uiteindelijk resulteert in een toename van DNA-breuken in de cel, en uiteindelijk celdood. Deze drugcombinaties zijn wel afhankelijk van de dosis en het blootstellingsschema (wanneer en hoelang) die gebruikt zijn: TFT-preincubatie kan OHP-geïnduceerde cytotoxiciteit verlagen, maar bij de TFT-SN38 combinaties waren er juist sterke synergistische interacties te constateren. Dit in tegenstelling bij 5FU, waar het totale cytotoxisch effect verhoogd kan worden wanneer cellen na 5FU-blootstelling aan SN38 blootgesteld worden. Dit was een vrij onverwachte bevinding, aangezien TFT en 5FU beide fluoropyrimidines zijn met overlappende werkingsmechanismen, en beide de synergie kunnen verhogen middels sequentiële blootstelling van de cellen aan deze drugs vergeleken met simultane blootstelling aan drugcombinaties. Dit verschil is mogelijk te verklaren op het niveau van veranderingen aan het DNA met betrekking tot gevormde eiwitcomplexen (betrokken bij DNA-strengontvouwning) in/aan het DNA die 'bevroren' komen te zitten door SN38, maar ook bij de aanwezigheid van nucleoside-analoga zoals 5FU. Het is

niet duidelijk of TFT zelf zulke complexen kan 'bevriezen' of dat het de formatie van deze complexen door SN38 kan bevorderen. Ook met betrekking tot de TFT-OHP combinaties hebben we laten zien dat TFT anders opereert dan 5FU in de combinatie met SN38 of OHP, hetgeen de waarde van dosis-blootstellingschema's illustreert en de integratie ervan in de farmacokinetische (wat het lichaam met de drugs doet) drugprofielen van deze lichaamsvreemde stoffen. Deze TFT-SN38 en TFT-OHP combinaties zijn geschikt om in vivo te onderzoeken, omdat synergisme is waargenomen bij verschillende blootstellingschema's en na gebruik van verschillende darmkankercellijnen, alhoewel de metabole en biologische interacties ten eerste onderzocht dienen te worden aler enige potentiële klinische potentie en effectiviteit voor deze drugs te kunnen creëren.

Conclusie

Algeheel samengevat kunnen we concluderen dat TP een belangrijke rol speelt op verschillende vlakken en niveau's aangaande de bestrijding van dikke darmkanker, en daardoor een interessant onderzoeksobject zal blijven met betrekking tot de overweging om er rekening mee te houden in de toekomstige klinische oncologische trials met TAS-102 en andere fluoropyrimidines, en wellicht ook antifolaten. Alhoewel nieuwe studies opgezet dienen te worden om de rol van TP in orale fluoropyrimidinegevoeligheid en angiogenese te verhelderen, moet men rekening houden met de rol van UP in fluoropyrimidineactivatie en het mechanisme van pro-angiogenese gemedieerd door effectormoleculen die pas van invloed zijn na de door TP-gekatalyseerde reacties. Deze aspecten van TP moeten verder worden onderzocht om te helpen in het ontwerpen van nieuwe therapieën (TAS-102) of het modificeren van huidige therapieën (capecitabine) waarbij TP betrokken is. Aanvullend zijn de duale eigenschappen van de TAS-102 formulering in de kliniek bij de behandeling van solide tumoren veelbelovend, omdat de huidige therapieën zich steeds meer baseren op het aanpakken van meerdere targets tegelijkertijd. Om deze reden zou er meer aandacht gegeven moeten worden aan het potentiële anti-angiogene effect van TPI, met name in vroege-fase klinische studies. Om de behandeling van gastrointestinale maligniteiten te verbeteren zou het interessant zijn om TAS-102 te combineren met andere angiostatische of cytotoxische agentia in toekomstige

klinische trials, zoals groeifactor(receptor)remmers en DNA-syntheseremmers als OHP en CPT-11.