

## Samenvatting

De standaard behandeling van ovariumcarcinoom (eierstokkanker) bestaat uit cytoreductieve chirurgie (zoveel mogelijk verwijderen van alle tumorgebieden) gevolgd door chemotherapie, bestaande uit een combinatie van platinabevattende geneesmiddelen en taxanen. Meestal wordt er behandeld met de combinatie carboplatin en paclitaxel. In een recente studie bij patiënten met gevorderd ovariumcarcinoom is aangetoond dat een combinatie van carboplatin met docetaxel leidt tot eenzelfde periode van progressievrije overleving en een verbeterde kwaliteit van leven vergeleken met de carboplatin plus paclitaxel combinatie. In het laboratorium is aangetoond dat docetaxel enkele voordelen heeft boven paclitaxel. Beide medicijnen hebben hetzelfde werkingsmechanisme in delende cellen. Ze stabiliseren de microtubuli waardoor geen depolymerisatie kan optreden en de voltooiing van de celdeling wordt verhinderd. Er zijn echter kleine verschillen tussen de twee medicijnen. Docetaxel heeft een ongeveer tweemaal hogere affiniteit voor binding aan  $\beta$ -tubuline en blijft langer in de cel aanwezig. Docetaxel stabiliseert de microtubuli beter dan paclitaxel. Naast het feit dat taxanen antitumor activiteit hebben, staan ze er ook om bekend dat ze angiogenese (vorming van nieuwe bloedvaten) kunnen remmen, een proces dat noodzakelijk is voor groei van de tumor en het ontstaan van metastasen (uitzaaiingen).

In dit proefschrift zijn verschillende aspecten van docetaxel onderzocht die mogelijk van belang zouden kunnen zijn voor de behandeling van kanker. Ovariumcarcinoomcellijnen afkomstig van patiënten en endotheelcellen afkomstig uit de ader van een navelstreng (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVECs) zijn gebruikt in de in vitro experimenten. Eerst is onderzocht in hoeverre docetaxel de beweeglijkheid van endotheelcellen, een noodzakelijk proces voor de vorming van nieuwe bloedvaten, kan beïnvloeden. Tevens is onderzocht in hoeverre het medicijn in staat is om de beweeglijkheid van tumorcellen te remmen, omdat bij primair ovariumcarcinoom het gevaar bestaat op metastasering in de buikholte. Aangezien het enzym cyclooxygenase-2 (COX-2) in verband wordt gebracht met overleving van tumorcellen is onderzocht, of de combinatie van docetaxel met de COX-2 remmer celecoxib zou kunnen leiden tot een verbeterd antitumor effect. Tenslotte, daar ovariumcarcinoomcellen leden van de Human Epidermal growth factor Receptor (HER) familie op hun celoppervlak tot expressie kunnen brengen, is onderzocht in hoeverre HER-gerichte monoklonale antilichamen zouden kunnen bijdragen aan remming van de celgroei door docetaxel.

In Hoofdstuk 2 zijn anti-angiogene eigenschappen van verschillende conventionele cytostatica onderzocht door gebruik te maken van HUVECs. Hiertoe is een panel microtubuli-gerichte stoffen geselecteerd, omdat is gebleken dat deze middelen de beweeglijkheid van cellen aantasten door de dynamiek van de microtubuli te verstoren. De medicijnen waren 1) docetaxel, bekend vanwege het vermogen om de microtubuli te stabiliseren door de dynamische reorganisatie en depolymerisatie te verstoren, 2) epothilone B, geen familie van de taxanen, maar ook in staat om microtubuli te stabiliseren, en 3) vinblastine, een stof die in staat is om polymerisatie van microtubuli te verhinderen waardoor de cel de celdeling evenmin kan voltooien. Twee andere bekende antikanker middelen zijn meegenomen tijdens de experimenten, cisplatine en

doxorubicine; beide medicijnen tasten de functionele ordening van DNA aan. Als eerste zijn de celgroeiremmende effecten van de cytotoxische stoffen onderzocht in HUVECs. De endotheelcellen werden gedurende 1 uur blootgesteld aan elk van de medicijnen om te bepalen bij welke concentratie 10% van de celgroei zou worden geremd vergeleken met de groei van controle (onbehandelde) cellen. De concentratie die op deze manier werd gevonden werd vastgesteld als de hoogst mogelijke niet-toxische concentratie (Highest Non-Toxic Concentration; HNTC). Daarna werden de HNTCs gebruikt in alle verdere experimenten en werden gevalideerd in parallele proeven voor celgroeiremming. Zodoende konden de effecten van equitoxische concentraties van de medicijnen onderling met elkaar worden vergeleken. De beweeglijkheid van endotheelcellen werd onderzocht in een wondproef voor migratie, in een 'transwell' systeem voor invasie en na uitzaaiing bovenop een extracellulaire matrix gel voor organisatie (vatvorming). Cisplatine en doxorubicine waren niet in staat om de beweeglijkheid van de endotheelcellen tegen te gaan. Daarentegen remden alle microtubuli-gerichte stoffen de angiogene eigenschappen van HUVECs significant ( $p < 0,05$ ). De remming van migratie en invasie bleek het duidelijkst zichtbaar bij docetaxel, hoewel dit effect niet significant verschilde van epothilone B en vinblastine. In het volgende experiment werden structurele veranderingen in de morfologie van endotheelcellen onderzocht in de wondproef na een 1-uurs blootstelling aan de medicijnen (HNTC). Acht uur na het aanbrengen van de wond werden tubuline en F-actine gekleurd en zichtbaar gemaakt met een fluorescentiemicroscop. Bij de controle cellen en de cellen behandeld met cisplatine of doxorubicine werden dezelfde morfologische kenmerken waargenomen; actine stresskabels konden worden onderscheiden in het cytoplasma van de cel en celuitstulpingen waren gevuld met tubuline-uitlopers in de richting waarin de cel zich bewoog. HUVECs behandeld met microtubuli-gerichte medicijnen lieten een ander beeld zien; ze leken zich niet te kunnen bewegen aan de rand van de wond. Zowel docetaxel als epothilone B zorgden voor een significant hogere tubuline kleuringsintensiteit ( $p < 0,01$ ), maar de intensiteit van de tubulinekleuring in cellen behandeld met vinblastine bleef onveranderd vergeleken met controle cellen. HUVECs behandeld met microtubuli-gerichte medicijnen bevatten minder stresskabels. In plaats daarvan werden F-actine ringen gevormd om de celkern heen, waardoor een gebrek aan oriëntatievermogen van de cel werd gesuggereerd. Actine uitstulpingen in de bewegingsrichting waren goeddeels afwezig. In het laatste experiment werd de activiteit van twee Rho GTPases, een moleculenfamilie die zich voornamelijk bezig houdt met de coördinatie van celbeweging, onderzocht. Van Cdc42 is bekend dat het de polariteit van de cel regelt zodat beweging in de gewenste richting in gang kan worden gezet. Rac1 is in staat om uitstulpingen (lamellipodia) te vormen, om polymerisatie van actine aan de kant van de bewegingsrichting van de cel te bevorderen en om nieuwe contacten te maken met de extracellulaire matrix. De activiteit van zowel Rac1 als Cdc42 wordt sterk beïnvloed door de dynamiek van actine en tubuline. HUVECs werden gedurende 1 uur behandeld met HNTCs van de verschillende medicijnen. Hierna werd gemeten hoeveel totaal en hoeveel actief Rac1 of Cdc42 aanwezig was in de cellen en dit werd vergeleken met de niveaus in controle cellen. Zoals verwacht hadden cisplatine en doxorubicine geen invloed op de activiteit van Rac1 of Cdc42. Microtubuli-gerichte stoffen waren echter zeer effectief in het remmen van de activiteit van beide eiwitten.

Gezamenlijk hebben deze experimenten in HUVECs aangetoond dat microtubuli-gerichte medicijnen, zoals docetaxel, in staat zijn de beweeglijkheid van endotheelcellen te beïnvloeden en tegelijkertijd de activiteit van Rac1 en Cdc42 te kunnen remmen waardoor veranderingen in het cytoskelet worden bewerkstelligd. Daarom zouden deze medicijnen, los van hun antitumor effect, van pas kunnen komen bij de remming van angiogenese in tumoren.

In Hoofdstuk 3 is onderzocht in hoeverre de microtubuli-gerichte medicijnen docetaxel, epothilone B en vinblastine in staat waren om de beweeglijkheid van ovariumcarcinoomcellen te remmen. In de experimenten werden cisplatine en doxorubicine meegenomen, evenals cytochalasine D, een stof die de F-actine polymerisatie remt. Het is bekend dat cytochalasine D de hoeveelheid actine filamenten kan verminderen en ook de dynamiek aan de uiteinden van de filamenten kan verstoren. De ovariumcarcinoomcellijnen A2780, H134, OVCAR-3, IGROV-1 en SKOV-3 werden geselecteerd. De HNTC van elk medicijn werd vastgesteld in iedere cellijn na een blootstellingperiode van 1 uur. Tevens werden de concentraties van de medicijnen berekend die zorgden voor 50% celgroeiremming (IC50) vergeleken met controle celgroei. De beweeglijkheid van ovariumcarcinoomcellen werd onderzocht in een wondproef voor migratie en in een 'transwell' systeem voor invasie. Spontane migratie en invasie waren grotendeels afwezig in geval van A2780 en H134. Migratie en invasie in IGROV-1, OVCAR-3 en SKOV-3 werden niet beïnvloed door cisplatine en doxorubicine. Microtubuli-gerichte medicijnen waren slechts in geringe mate in staat om deze processen te remmen. Cytochalasine D was significant effectief bij HNTC in de migratieproef ( $p < 0,001$ ) en bij IC50 in de invasieproef ( $p < 0,01$ ). De veranderingen in het cytoskelet in IGROV-1, OVCAR-3 en SKOV-3 werden zichtbaar gemaakt in de wondproef. Cellen werden blootgesteld aan IC50 concentraties van docetaxel of cytochalasine D gedurende 1 uur gevolgd door het aanbrengen van een wond. Vervolgens werden 8 uur later tubuline en F-actine gekleurd. Migrerende controle cellen hadden brede lamellipodia gevuld met microtubuli in de bewegingsrichting. Na behandeling met docetaxel werd slechts een marginale toename van de tubuline kleuringsintensiteit waargenomen. Echter waren na behandeling met cytochalasine D dikke lagen F-actine zichtbaar aan de randen van de cel en de karakteristieke brede lamellipodia waren verdwenen. In OVCAR-3 werd vervolgens vastgesteld hoezeer docetaxel of cytochalasine D zouden kunnen leiden tot afname van Rac1 of Cdc42 activiteit. De totale hoeveelheid van de eiwitten werd niet beïnvloed. De activiteit van Rac1 werd licht geremd onder invloed van docetaxel en sterker door cytochalasine D. De activiteit van Cdc42 bleef onaangedaan. Samengevat is gebleken dat HNTCs, of zelfs IC50 concentraties, van microtubuli-gerichte medicijnen slechts een gering effect hadden op de beweeglijkheid van tumorcellen. Van belang is de bevinding dat het actinegerichte middel cytochalasine D het best in staat was om zowel de celmigratie als de invasie te remmen. Daarom zou de ontwikkeling van stoffen die ingrijpen op de dynamiek van actine interessant kunnen zijn als mogelijke antikanker behandeling. Dergelijke stoffen zouden voornamelijk ingezet kunnen worden bij patiënten met ovariumcarcinoom na cytoreductieve chirurgie om metastasevorming in de buikholte te voorkomen.

Het enzym COX katalyseert de synthese van prostaglandines uit arachidonzuur. Twee isovormen zijn gekarakteriseerd waarvan COX-1 een homeostase-eiwit is dat constitutief tot

expressie wordt gebracht in verschillende weefsels, terwijl COX-2 expressie gereguleerd wordt door groeifactoren, cytokines en oncogenen. Het is gebleken dat inductie van COX-2 verhoogde celgroei, remming van apoptose (geprogrammeerde celdood) en versnelde celbeweging en -adhesie tot gevolg heeft. In de kliniek werden en worden remmers van COX-2 onderzocht voor hun potentie om de effecten van chemotherapie te versterken. In Hoofdstuk 4 is onderzocht of de COX-2 remmer celecoxib in staat is om de antitumor effecten van docetaxel of cisplatine te versterken. Dit onderzoek werd in vitro uitgevoerd bij de ovariumcarcinoomcellijnen A2780, H134, OVCAR-3 en IGROV-1. Aangezien het COX-2 eiwit niet kon worden gedetecteerd in deze cellijnen, werden de COX-2 positieve humane coloncarcinoomcellijnen WiDr, HT29 en SW1398 (dikke darmkanker) toegevoegd aan de experimenten. In proeven gericht op celgroeiremming zijn de effecten van celecoxib, docetaxel, cisplatine alléén en combinaties van celecoxib met elk van de antikanker medicijnen onderzocht. Mogelijke antagonistische, additieve of synergistische effecten werden berekend met de Chou en Talalay formule. De cellen werden voortdurend blootgesteld aan celecoxib terwijl een 1-uurs behandeling van cisplatine of docetaxel werd gehanteerd. Het was volkomen duidelijk dat de combinatie van cisplatine met celecoxib leidde tot een antagonistisch effect op de celgroeiremming, terwijl de combinatie docetaxel plus celecoxib resulteerde in een additief of licht antagonistisch effect. De antagonistische effecten van celecoxib gecombineerd met cisplatin werden gemeten ongeacht de manier van toediening: celecoxib 3 uur voorafgaand aan het medicijn, tegelijkertijd met het medicijn of toegevoegd na de 1-uurs blootstelling aan cisplatin. Daarnaast werden de antagonistische effecten gemeten in alle cellijnen onafhankelijk van de expressieniveaus van COX-2. In vervollexperimenten werden medicijnconcentraties gebruikt die zouden leiden tot 50% celgroeiremming wanneer ze gecombineerd werden gegeven; steeds ging de toediening van celecoxib 3 uur vooraf aan toevoeging van cisplatine of docetaxel. Door de activiteit van caspase-3 te analyseren en de sub-G0 fractie van de celpopulatie te berekenen met 'fluorescence-activated cell sorting' (FACS) in COX-2 negatieve H134 cellen en COX-2 positieve WiDr cellen werd aangetoond, dat celecoxib het apoptotische effect van docetaxel versterkte en het apoptotische effect van cisplatine verminderde. Analyse van de celcyclus liet zien dat blootstelling aan celecoxib, docetaxel of een combinatie van beide middelen geen verandering teweeg bracht in de fractieverdeling in H134 en WiDr cellen. Echter was de accumulatie van cellen in de G2/M fractie onder invloed van cisplatin sterk verminderd door toevoeging van celecoxib. Deze vermindering was zelfs significant in WiDr cellen ( $p < 0,05$ ). In een poging om het antagonisme tussen cisplatine en celecoxib te begrijpen werden p-Akt en p-ERK1/2 onderzocht na behandeling van H134 en WiDr. De niveaus van p-Akt bleven onveranderd. De niveaus van p-ERK1/2 namen toe in H134, maar niet in WiDr, waardoor hiermee de negatieve interactie tussen de medicijnen niet kon worden verklaard. In een laatste experiment werd de hoeveelheid platina-DNA adducten gemeten door middel van atoomabsorptiespectrofotometrie om de door cisplatine veroorzaakte DNA schade te kunnen bepalen. Van belang is de waarneming dat na de 1-uurs blootstelling aan cisplatine de concentratie platina-DNA adducten ongeveer tweemaal zo laag was in aanwezigheid van celecoxib. Samengevat toonden de experimenten aan dat tumorcellen niet noodzakelijkerwijs COX-2 tot expressie hoeven te brengen om remming van celgroei door celecoxib te verkrijgen. Over het algemeen resulteerde

een combinatie van celecoxib en docetaxel in een additief effect op de celgroeiremming en werden de apoptotische kenmerken versterkt. Voor wat betreft de combinatie van cisplatine en celecoxib werd echter een antagonistisch effect gemeten op de celgroeiremming ongeacht de expressiestatus van COX-2. Klinische studies waarin combinaties van cisplatine en celecoxib worden onderzocht dienen daarom met het nodige voorbehoud te worden uitgevoerd.

Op dit moment worden antikanker medicijnen gecombineerd met zogenaamde 'targeting agents' om de behandeling van kanker te verbeteren. Onder 'targets' worden eiwitten verstaan, die bij kanker belangrijk zijn voor celgroei, overleving, angiogenese, etc. In dit kader vormen de leden van de HER familie een aantrekkelijk doelwit om hun functie te remmen. Bij ovariumcarcinoom kan in 29-62% van de gevallen EGFR expressie worden aangetoond, terwijl bij ongeveer 13-35% van de patiënten in meer of mindere mate HER2 wordt aangetroffen. De prognostische waarde van deze receptoren, die zich op het celoppervlak bevinden, is met betrekking tot overleving nog onduidelijk. Recentelijk is HER3 onder de aandacht gekomen bij ovariumcarcinoom. Bij 53,4% van de ovariumcarcinoompatiënten komt HER3 tot expressie en deze expressie wordt geassocieerd met een verminderde overlevingskans. In Hoofdstuk 5 is onderzocht of remming van HER familieleden zou kunnen leiden tot een versterking van de celgroeiremming door docetaxel. De EGFR, HER2, HER3, HER4 expressieniveaus varieerden tussen de ovariumcarcinoomcellijnen A2780, OVCAR-3, IGROV-1, H134 en SKOV-3. Voor de experimenten werden OVCAR-3 (hoog EGFR, laag HER2, aanwezigheid van HER3), IGROV-1 (laag EGFR, modaal HER2, aanwezigheid van HER3) en SKOV-3 (hoog EGFR, hoog HER2, afwezigheid van HER3) geselecteerd vanwege de verschillen in receptorexpressie. In de experimenten werden docetaxel concentraties gebruikt die resulteerden in 50% celgroeiremming na een blootstellingperiode van 1 uur. Om de functie van de receptoren te remmen werden de monoklonale antilichamen 1) cetuximab gericht tegen EGFR, 2) trastuzumab gericht tegen HER2 en 3) pertuzumab gericht tegen de regio van HER2 vereist voor dimerisatie met HER3 (blokkeert tevens de EGF-gemedieerde fosforylatie van HER2) gebruikt. De monoklonale antilichamen werden 2 uur voorafgaande aan de 1-uurs blootstelling aan docetaxel toegevoegd en bleven aanwezig gedurende de gehele looptijd van het experiment. De proeven gericht op celgroeiremming toonden aan dat cetuximab alléén of gecombineerd met docetaxel de groei van OVCAR-3 en IGROV-1 significant remde ( $p < 0,05$ ). Antilichamen gericht tegen HER2 waren niet effectief wanneer ze afzonderlijk werden toegediend. Gezamenlijke toevoeging van cetuximab plus pertuzumab aan docetaxel bij OVCAR-3 en IGROV-1 en, in mindere mate, trastuzumab gecombineerd met docetaxel bij OVCAR-3, versterkten wel de celgroeiremming door docetaxel. De SKOV-3 celgroei werd niet significant beïnvloed door welk antilichaam dan ook. De caspase-3 assay werd gebruikt om apoptose te meten. Cetuximab gecombineerd met docetaxel zorgde voor een verhoogde caspase-3 activiteit in OVCAR-3. Dit was ook het geval wanneer cetuximab en pertuzumab gezamenlijk werden toegevoegd aan docetaxel in IGROV-1 en SKOV-3 ( $p < 0,05$ ). Vervolgens werd onderzocht in hoeverre de receptoren geactiveerd konden worden door Epidermal Growth Factor (EGF) of heregulin (HRG) in de drie cellijnen. EGF was in staat om p-EGFR te induceren, terwijl dit effect volledig teniet kon worden gedaan door cetuximab in OVCAR-3 en IGROV-1 en gedeeltelijk in SKOV-3. Cetuximab remde ook p-ERK1/2 in alle cellijnen. In OVCAR-3 kon verhoging van p-Akt na stimulatie door EGF worden

verhinderd door cetuximab. Stimulatie door HRG induceerde p-EGFR in OVCAR-3, terwijl ook dit effect volledig kon worden verhinderd door cetuximab. Inductie van p-ERK1/2 en p-Akt in OVCAR-3 kon echter alleen maar worden voorkomen door een combinatie van cetuximab en pertuzumab. In IGROV-1 en SKOV-3 gestimuleerd door HRG was geen verhoogde p-EGFR waarneembaar. Pertuzumab was in staat om p-ERK1/2 in IGROV-1 te remmen, wanneer dit werd gecombineerd met cetuximab. In OVCAR-3 en IGROV-1, maar nauwelijks in SKOV-3 konden dus functionele EGFR en HER3 signaaltransductieroutes worden aangetoond. In een laatste experiment werd onderzocht in hoeverre EGF en HRG in staat waren om HER2 te stimuleren door tyrosinefosforylatie, een HER2 activatiekenmerk, te meten. Zowel in OVCAR-3 als in IGROV-1 kon fosforylatie van HER2 worden aangetoond, die ook kon worden verhinderd door pertuzumab. In SKOV-3 was al een basaal fosforylatieniveau van HER2 aanwezig dat noch door EGF of HRG kon worden versterkt, noch door pertuzumab kon worden verminderd. In OVCAR-3 en IGROV-1, maar niet in SKOV-3, kon dus een functionele HER2-gemedieerde signaaltransductieroute worden aangetoond. Samengevat toonden de experimenten uitgevoerd bij de ovariumcarcinoomcellijnen met verschillende HER familie expressieprofielen aan dat remming van functionele receptoren de celgroeremming door docetaxel zou kunnen versterken.

De algemene conclusie van dit proefschrift is dat docetaxel anti-angiogene eigenschappen blijkt te hebben bij concentraties die de proliferatie van endotheelcellen niet schadelijk beïnvloeden. Docetaxel is echter marginaal effectief in het remmen van de beweeglijkheid van ovariumcarcinoomcellen bij subtoxische concentraties. In het algemeen resulteert een combinatie van docetaxel met celecoxib in een additief effect op de celgroeremming van ovariumcarcinoomcellen, terwijl de combinatie de apoptosekenmerken versterkt. Bij ovariumcarcinoomcellen, die HER familieleden tot expressie brengen kan remming van functionele receptoren leiden tot een versterkte gevoeligheid voor docetaxel. Dit proefschrift heeft inzicht gegeven in verschillende aspecten van docetaxel die bijdragen aan een beter begrip van het werkingsmechanisme en aan mogelijkheden om dit medicijn te combineren met 'targeting agents' teneinde de behandeling van ovariumcarcinoom te verbeteren.