



**Universiteit  
Leiden**  
The Netherlands

**Apoptin gene therapy in head and neck cancer**  
Schoop, R.A.L.

**Citation**

Schoop, R. A. L. (2009, December 17). *Apoptin gene therapy in head and neck cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15030>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/15030>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

# 8

## **Nederlandse samenvatting**

Hoofd-hals kanker is in Nederland de zesde meest voorkomende maligniteit. Van de ruim 81.000 nieuwe gevallen van kanker in 2005 waren het er 2650 in het hoofd-halsgebied. In vergelijking met andere landen zoals Duitsland en Frankrijk komt er in Nederland onder mannen minder vaak mond- keelholte en strottenhoofdkanker voor. Opvallend genoeg is dit verschil bij vrouwen minder groot. Na hart- en vaatziekten is kanker in Nederland de belangrijkste doodsoorzaak en is er net als bij longkanker, maagkanker, blaaskanker en enkele andere vormen een sterke relatie tussen het ontstaan van hoofd-hals kanker en roken.

In het lichaam is er een strikt gereguleerd evenwicht tussen het aantal cellen dat er bijkomt en het aantal cellen dat doodgaat. Door middel van apoptose – geprogrammeerde celdood – wordt dit evenwicht nauwgezet gereguleerd. Kanker ontstaat als dit evenwicht ontregeld is en er meer cellen bijkomen dan dat er georganiseerd doodgaan. Cellen kunnen door signalen uit de omgeving of door interne signalen overgaan tot apoptose. Een cel die niet functioneel is gaat onder normale omstandigheden in apoptose doordat het controle mechanisme de cel dwingt tot geprogrammeerde celdood. Bij kanker faalt dit mechanisme en resulteert dit in een ongecontroleerde celdeling, een eigenschap die frequent voorkomt bij de vorming van kanker.

Patiënten met hoofd-hals kanker worden óf chirurgisch óf met chemotherapie óf met radiotherapie óf met een combinatie hiervan behandeld. Deze behandeling is meestal sterk mutilerend en geeft nog steeds ondanks de verbeterde toepassing van de therapeutische opties een teleurstellende overlevings kans. Ter verbetering van de overleving van kankerpatiënten en behoud van de organen bij deze patiënt wordt er onderzoek gedaan naar nieuwe therapieën zoals gentherapie. Gentherapie is het introduceren van genetisch materiaal om zieke cellen te kunnen behandelen. Het is aan te nemen dat verschillende aandoeningen zoals stofwisselingsziekten, kanker, spierziekten en degeneratieve ziekten zoals Alzheimer en Parkinson in aanmerking komen voor gentherapie. Bij gentherapie wordt het gen dat codeert voor het therapeutische eiwit met behulp van een vector de cel

ingebracht. Meestal wordt er gebruik gemaakt van een virale vector. Dit virus is zo ontworpen dat het genetisch materiaal in de cel kan brengen en in te bouwen in het genoom van de gastheer cel waarna het tot expressie komt in de cel. Verschillende vormen van genterapie worden momenteel in zowel klinische als preklinische stadia onderzocht en toegepast.

Apoptin, het van het 'chicken anemia virus' afkomstige eiwit is in staat om verschillende soorten tumorcellen over te laten gaan tot apoptose. Opmerkelijk genoeg gaan gezonde cellen, niet in apoptose. De verklaring voor deze tumorspecifieke eigenschap lijkt te liggen in het feit dat apoptin in tumorcellen in de celkern zit én gefosforyleerd is. Dit in tegenstelling tot normale cellen waarbij apoptin in het cytoplasma zit en niet gefosforyleerd is (**hoofdstuk 1**).

**Hoofdstuk 2** beschrijft het effect van apoptin in een matig gedifferentieerd mondbodem plaveiselcelcarcinoom cellijn met een gemuteerd niet-functioneel p53. Nadere analyse laat zien dat behandeling met apoptin resulteert in caspase-3 activatie en afgifte van cytochroom c uit de mitochondria. Behandeling van de cellen met p53 is evenals apoptin effectief in het induceren van celdood in de tumorcellen. Echter indien Bcl-xL wordt toegevoegd aan de behandeling van p53 en apoptin dan neemt het effect van p53 af, maar niet dat van apoptin. De cytochroom c afgifte na gelijktijdige behandeling met p53 en Bcl-xL was sterk verminderd. Daarentegen gaf de co-expressie van apoptin en Bcl-xL in de tumorcellen nog steeds afgifte van cytochroom c. Bcl-xL is een anti-apoptose element dat verantwoordelijk kan zijn voor het falen van conventionele therapieën zoals chemotherapie en bestraling. In **hoofdstuk 3** wordt in een tweetal hoofd-hals tumorcellijnen, de één gevoelig en de ander minder gevoelig voor bestraling, gekeken naar het effect van de combinatie van apoptin en bestraling. Het resultaat van de toevoeging van apoptin aan de bestraling was dat er meer cellen dood gingen. Echter gaf het toevoegen van het controle middel LacZ geen additief resultaat. Ook bij deze cellen was er sprake van celdood na activatie van caspase-3 én cytochroom c afgifte.

De eerste stappen van een (nieuw) geneesmiddel onderzoek zijn *in-vitro* en *in-vivo* laboratoriumproeven. De huidige proeven in reageerbuizen en de proefdiermodellen met naakte muizen en hamsters hebben alle hun beperkingen. In **hoofdstuk 4** wordt het muizenmodel onderzocht waarin met behulp van het carcinogeen 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) orale plaveiselcel carcinomen geïnduceerd kunnen worden. Gedurende 16 weken werd er 3 maal per week 4NQO in de mond aangebracht en ontstonden na verloop van tijd representatieve tumoren die immunohistochemisch sterke overeenkomsten hebben met die van de mens. Veertig weken na het starten van het aanbrengen van de 4NQO hadden de tumoren voldoende volume om tijdens laboratoriumonderzoek met geneesmiddelen gebruikt te worden. In het 4NQO tumormodel ontstaan er voorafgaand aan de plaveiselcel carcinomen pre-maligne dysplastische afwijkingen. Deze afwijkingen vragen een andere benadering en behandeling dan de kwaadaardige plaveiselcel carcinomen.

In **hoofdstuk 5** worden de dysplastische afwijkingen die in het begin van het experiment ontstaan nader bekeken. Op basis van architectonische en cytologische kenmerken worden de afwijkingen ingedeeld in milde, matige en ernstige dysplasie. Alle 3 de opeenvolgende stadia van dysplasie werden gezien en de afwijkingen hadden sterke overeenkomsten met afwijkingen die gezien worden in de mens.

In **hoofdstuk 6** wordt het *in-vivo* effect van apoptin bestudeerd in het 4NQO model. Nadat er representatieve tumoren waren ontstaan werden deze intratumoraal behandeld met een adenovirus vector die apoptin tot expressie brengt (AdMLP.apoptin). Een aanzienlijk deel van de tumorcellen die apoptin bevatten ging in apoptose. De tumoren behandeld met het controle AdCMV.LacZ dat  $\beta$ -galactosidase tot expressie brengt, ondergingen nauwelijks apoptose. Cellen afgenomen van de tumoren die *in-vitro* in kweek werden genomen werden eveneens behandeld met apoptin. Ook deze cellen ondergingen apoptose en activeerden caspase-3, hetgeen ook *in-vivo* in het 4NQO model gezien werd.



