



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Novel mediators of anti-tumor immunity: dissecting intratumoral immune responses at the single-cell level**

Vries, N.L. de

### **Citation**

Vries, N. L. de. (2022, October 6). *Novel mediators of anti-tumor immunity: dissecting intratumoral immune responses at the single-cell level*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3439882>

Version: 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/1887/3439882>

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

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

### De geschiedenis van kanker

Het woord kanker stamt af van het Griekse 'καρκίνος' (karkinos) en het Latijn 'cancer', wat beide krab betekent. Deze naam werd voor het eerst gebruikt door de Griekse arts Hippocrates (ca. 460 v.Chr. – 370 v.Chr.) toen hij zag dat tumoren met hun vele bloedvaten die alle kanten op groeien, lijken op de ledematen van een krab. Wereldwijd staat de krab nog steeds symbool voor de ziekte kanker. Hoewel kanker wordt gezien als een moderne ziekte, kwam het door de eeuwen heen voor. Lang was er geen verklaring of behandeling van kanker voorhanden. In de negentiende eeuw zorgden de opkomst van de microscoop en de herkenning van kankercellen voor veel vooruitgang in de wetenschap over kanker. Door de kankercellen beter te bestuderen, kon men zien dat de ziekte ontstond in een primaire tumor, en zich vervolgens verspreidde naar andere delen in het lichaam. In die tijd was de enige behandeling het operatief verwijderen van de tumor, wat door de slechte hygiëne vaak een risicovolle ingreep was. De opkomst van kankerverwekkende stoffen zoals vervuiling door industrie en tabaksrook, maar ook de stijging in levensverwachting, leidde tot een gestage toename van het aantal kankergevallen. Toen in 1895 door de Duits natuurkundige Röntgen radioactieve röntgenstralen werden ontdekt, werd bestraling met radiotherapie al snel ingezet als effectieve behandeling van kanker mede dankzij baanbrekend werk van de Pools-Frans schei- en natuurkundige Marie Curie (1867 – 1934), de eerste vrouwelijke Nobelprijs winnaar. Tijdens de Tweede Wereldoorlog werd met onderzoek naar de gevolgen van mosterdgas per toeval ontdekt dat mensen die ermee in aanraking kwamen een daling in het aantal witte bloedcellen lieten zien. De Amerikaanse arts Rhoads en farmacologen Goodman en Gilman speelden hier een belangrijke rol. Uit mosterdgas werd het allereerste chemotherapeuticum ontwikkeld voor de behandeling van bloedkanker. Hoewel radiotherapie en chemotherapie zich ondertussen veel verder hebben ontwikkeld, vormen ze tot op heden samen met chirurgie belangrijke pijlers in de behandeling van kanker. Met de opkomst van nieuwe technologieën zijn er steeds meer verklaringen gevonden voor het ontstaan van kanker, en zijn er nieuwe behandelmethode ontwikkeld die de vooruitzichten voor kankerpatiënten aanzienlijk hebben verbeterd. Desalniettemin blijven kankerpreventie en -bestrijding cruciaal. Momenteel krijgen in Nederland jaarlijks ongeveer 124.000 mensen de diagnose kanker, waarvan 65% vijf jaar na de diagnose nog in leven is. Elk jaar overlijden ongeveer 46.000 mensen aan kanker, waarmee kanker in Nederland de meest voorkomende doodsoorzaak is. Naast de gevolgen voor de gezondheid van de patiënt, heeft kanker ook een grote maatschappelijke en economische impact.

### Het ontstaan van kanker

Kanker is een ziekte die wordt gekenmerkt door ongeremde en ongecontroleerde celtgroei. Kanker ontwikkelt zich geleidelijk langs evolutionaire principes, waarbij er in cellen in ons lichaam in de loop van de tijd fouten (mutaties) in het DNA ontstaan. Deze mutaties treden meestal sporadisch op, maar kunnen ook erfelijk zijn. Alleen cellen waarin toevalligerwijs een opeenstapeling van specifieke mutaties zijn opgetreden, en die daardoor een selectief groeivoordeel krijgen, kunnen uitgroeien en het functioneren van de gezonde cellen in het

lichaam verstoren. Met name mutaties in genen die van belang zijn voor de celdeling staan centraal in het ontstaan van kanker. Onder deze typen genen vallen proto-oncogenen, tumorsuppressorgenen, genen die de apoptose (geprogrammeerde celdood) regelen, en genen die de DNA-repair regelen. De genetische basis van kanker werd in 1914 erkend door de Duits zoöloog Theodor Boveri. Lang dacht men dat zulke genetische mutaties voldoende waren om kanker te krijgen, maar inmiddels weten we dat andere cellen in de omgeving van kankercellen, zoals bepaalde typen bindweefselcellen en afweercellen, ook wel immuuncellen genoemd, de ontwikkeling en kwaadaardige progressie van kanker kunnen beïnvloeden.

### **De rol van het immuunsysteem bij kanker**

De afgelopen twintig jaar is er veel vooruitgang geboekt in het wetenschappelijk onderzoek naar de rol van het immuunsysteem in het voorkomen en bestrijden van kanker, ondanks dat de eerste experimenten hierover al meer dan honderd jaar geleden werden uitgevoerd. Het belang van het immuunsysteem in het voorkomen en bestrijden van kanker werd met name erkend door observaties van een verhoogde incidentie van kanker bij transplantatie patiënten die immuunsuppressiva gebruiken, patiënten met immuundeficiënties, en muismodellen waarin essentiële componenten van het immuunsysteem werden uitgeschakeld. Het immuunsysteem helpt het lichaam om kanker te bestrijden door ontspoorde eigen lichaamscellen op te ruimen. Om dat te kunnen doen, is het essentieel dat immuuncellen de kankercellen herkennen en geactiveerd worden.

We hebben een breed scala aan immuuncellen met diverse functies, die onderverdeeld kunnen worden in verschillende verdedigingslinies. Het aangeboren immuunsysteem kan een snelle, algemene immuunreactie tegen kankercellen in gang zetten. Belangrijke (cellulaire) spelers in de aangeboren immuniteit zijn lymfoïde cellen zoals 'innate lymphoid cells' (ILCs) en 'natural killer' (NK)-cellen (zie **Figuur 1, Hoofdstuk 1**). ILCs en NK-cellen kunnen de kankercellen herkennen, bijvoorbeeld aan de hand van stressmoleculen op het oppervlak van kankercellen, en een immuunreactie in gang zetten. Daarnaast kunnen zij de afwezigheid van speciale oppervlakte moleculen op kankercellen herkennen als lichaamsvreemd. Bijna alle cellen in ons lichaam bevatten moleculen op de celmembraan waarmee delen van eiwitten afkomstig uit de binnenkant van de cel worden gepresenteerd. Cellen presenteren hiermee als het ware een stukje van 'zichzelf' aan hun omgeving in gespecialiseerde moleculen die humaan leukocyten antigenen (HLA) worden genoemd. Myeloïde cellen zijn ook onderdeel van het aangeboren immuunsysteem, en bestaan onder andere uit dendritische cellen, macrofagen en monocytten (zie **Figuur 1, Hoofdstuk 1**). Myeloïde cellen kunnen lichaamseigen of lichaamsvreemde eiwitdelen (antigenen) fagocyteren en presenteren aan het adaptieve immuunsysteem (antigeen-presenterende cellen). Ze zetten een immuunreactie in gang en werken intensief samen met het adaptieve immuunsysteem om de kankercellen te bestrijden. In het adaptieve immuunsysteem spelen B-lymfocyten en T-lymfocyten (helper CD4<sup>+</sup> T-cellen en cytotoxische CD8<sup>+</sup> T-cellen) een belangrijke rol (zie **Figuur 1, Hoofdstuk 1**). In tegenstelling tot aangeboren immuuncellen, werken B- en T-cellen met specifieke antigeenreceptoren, het immunoglobuline en de

T-celreceptor, respectievelijk. Hierdoor zijn ze in staat om vrijwel elk antigeen te herkennen. Het adaptieve immuunsysteem geeft dus een specifieke immunreactie, maar heeft meer tijd nodig dan het aangeboren immuunsysteem. Daarentegen kunnen cellen van het adaptieve immuunsysteem lang bijdragen aan het immunologische geheugen voor kanker. Tot slot zijn er nog immuuncellen die eigenschappen bezitten van zowel het aangeboren als het adaptieve immuunsysteem, zoals gamma delta ( $\gamma\delta$ ) T-cellen (zie **Figuur 1, Hoofdstuk 1**). In een continu proces, genaamd immuunsurveillance, zijn onze immuuncellen op zoek naar antigenen die cellen in ons lichaam (zoals kankercellen) op hun oppervlak laten zien. Antigeen-presenterende cellen, bijvoorbeeld dendritische cellen, kunnen verdachte tumor-antigenen op kankercellen herkennen. Ze nemen deze antigenen op, en brengen ze naar de lymfeklieren, waar de antigenen gepresenteerd worden aan naïve T-cellen. T-cellen die specifiek dat verdachte tumor-antigeen herkennen met hun T-celreceptor, worden geactiveerd. Deze geactiveerde T-cellen vermeerderen zich en migreren naar de tumor, waar cytotoxische ( $CD8^+$ ) T-cellen de kankercellen die hetzelfde antigeen laten zien kunnen herkennen en vernietigen. Helper ( $CD4^+$ ) T-cellen geven verschillende soorten cytokinen af die de werking van  $CD8^+$  T-cellen stimuleren. De aanmaak van T-cellen tegen tumor-specifieke antigenen met de hulp van dendritische cellen is schematisch weergegeven in **Figuur 2 van Hoofdstuk 1**. T-celresponsen worden in toom gehouden door de aanwezigheid van immuun checkpoints, die ervoor zorgen dat de immunreactie zo min mogelijk schade aanricht aan gezonde weefsels in het lichaam. Cytotoxische immuuncellen van zowel het aangeboren als het adaptieve immuunsysteem (bijvoorbeeld NK-cellen en  $CD8^+$  T-cellen) kunnen na herkenning de kankercellen vernietigen via twee belangrijke routes: i) het afscheiden van granules die cytotoxische moleculen bevatten (perforine, granzymen), en ii) expressie van moleculen van de 'cell death pathway' (Fas-ligand, TRAIL-ligand).

### Immuun ontsnappingsmechanismen van kanker

Het immuunsysteem speelt een cruciale rol bij het tegengaan van kanker, waarbij er een belangrijke rol is weggelegd voor  $CD8^+$  T-cellen. Wanneer  $CD8^+$  T-cellen de verdachte tumor-antigenen op kankercellen herkennen, kunnen ze de kankercellen vernietigen. Uit onderzoek blijkt dat patiënten die veel van deze cytotoxische T-cellen in hun tumor hebben, een betere overleving hebben dan patiënten bij wie dat niet zo is. Door de opeenstapeling van specifieke mutaties in kankercellen kunnen er echter varianten ontstaan die de herkenning en vernietiging van het immuunsysteem omzeilen. Kankercellen kunnen zich dus aanpassen en zo ontsnappen aan de immuunsurveillance. Een van de meest onderzochte ontsnappingsmechanismen van tumoren is het afschakelen van de expressie van HLA-moleculen op het oppervlak van kankercellen. Hierdoor is er geen antigeen presentatie meer, en kunnen de T-cellen de kankercellen niet meer herkennen en vernietigen. Daarnaast zijn er ook immuuncellen die de kankercellen kunnen helpen overleven door de immunreactie te onderdrukken. Voorbeelden hiervan zijn een subtype van  $CD4^+$  T-cellen die regulatoire T-cellen worden genoemd, alsook subtypen van myeloïde cellen. Ten slotte kunnen kankercellen zich beschermen tegen T-celresponsen door moleculen tot expressie te brengen die kunnen binden aan inhiberende immuun checkpoints op T-cellen, wat een remmend signaal aan de T-cellen geeft (zie **Figuur 3, Hoofdstuk 1**). De interactie tussen

immuuncellen en kankercellen is dus zeer complex.

### **Immuun checkpoint blokkade: doorbraak in kankertherapie**

Onderzoek naar de rol van T-cellen in de immuunrespons tegen kanker heeft geleid tot de ontwikkeling van nieuwe immuuntherapieën die erop gericht zijn om de T-cellen te helpen en bij te sturen. Waar chemotherapie en radiotherapie erop gericht zijn om de kankercellen zelf te vernietigen of hun celdeling te remmen, is het doel van immuuntherapie om het eigen immuunsysteem te activeren of te versterken om de kankercellen op te ruimen. Een grote doorbraak in de behandeling van kanker is immuuntherapie met checkpointremmers. Deze vorm van immuuntherapie richt zich op het blokkeren van het remmende signaal van de immuun checkpoint moleculen PD-1 en/of CTLA-4 op de T-cellen met hun liganden PD-L1/PD-L2 en B7.1/B7.2, respectievelijk, op de kankercellen. Dit wordt gedaan met therapeutische antistoffen (anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4) die specifiek de eiwitten PD-1, PD-L1 of CTLA-4 herkennen (zie **Figuur 3, Hoofdstuk 1**). Door deze specifieke antilichamen toe te dienen die de blokkades opheffen, worden de T-cellen geactiveerd en kunnen ze de kankercellen vernietigen. Voorbeelden van checkpointremmers zijn nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab en ipilimumab. Deze doorbraak leverde kankeronderzoekers James P. Allison en Tasuku Honjo de Nobelprijs voor Fysiologie of Geneeskunde op in 2018. Immuuntherapie met checkpointremmers kan zeer effectief zijn bij de behandeling van verschillende typen kanker zoals huidkanker, longkanker, en bepaalde soorten darmkanker. Daarnaast zijn er andere soorten immuuntherapie in opkomst, zoals CAR-T-therapie en therapeutische vaccins. Bij CAR-T-therapie worden de eigen T-cellen genetisch aangepast om een speciale receptor (CAR; chimerische antigeenreceptor) tot expressie te brengen, waarmee de T-cellen de kankercellen kunnen herkennen en vernietigen. CAR-T-therapie kan zeer effectief zijn bij verschillende soorten bloedkankers. Therapeutische vaccins hebben als doel om T-cel responsen tegen tumor-specifieke antigenen te stimuleren. Er bestaan verschillende soorten therapeutische vaccins tegen kanker, waaronder vaccins met eiwitten of eiwitdelen, vaccins met DNA- of RNA-moleculen, en vaccins met dendritische cellen. Het is nog grotendeels een experimentele therapie voor de behandeling van kanker.

### **Uitdagingen op het gebied van immuuntherapie**

Immuuntherapie wordt sinds 2011 ingezet als nieuwe behandeling van kanker. Het laat zeer effectieve responsen zien bij verschillende typen kanker. Op dit moment heeft echter maar een kleine groep van de patiënten baat bij immuuntherapie. Bovendien kan er resistentie tegen de immuuntherapie optreden. Het is daarom van belang om meer inzicht te krijgen in de factoren die de respons van een patiënt op immuuntherapie bepalen, en om nieuwe behandelingsmogelijkheden te ontwikkelen. Om dat te kunnen doen, is het cruciaal om te weten welke rol het immuunsysteem precies speelt bij patiënten met kanker, zodat de immuuntherapie afgestemd kan worden op de tumor. T-cellen hebben een centrale rol als targets voor immuuntherapie, en er is veel onderzoek verricht naar de biologie en functie van T-cellen in tumoren. Echter zijn er, naast T-cellen, nog vele andere soorten immuuncellen in tumoren waar nog niet veel onderzoek naar gedaan is. Over bijvoorbeeld de rol van ILCs, NK-cellen en  $\gamma\delta$  T-cellen in de anti-tumor immuunreactie en in respons op immuuntherapie is

nog weinig bekend. De afgelopen jaren zijn er nieuwe, 'single-cell' technologieën ontwikkeld die het mogelijk maken om het eiwit en genetisch profiel van individuele cellen te bepalen. Voorbeelden van die nieuwe technologieën zijn massa cytometrie en 'single-cell RNA-sequencing'. Met deze nieuwe, 'single-cell' technologieën kunnen we de verschillende typen immuuncellen en hun functie in tumoren in detail in kaart brengen (zie **Figuur 4, Hoofdstuk 1**). Dit geeft ons een uniek platform om de anti-tumor immuunreacties van cellen van zowel het aangeboren als het adaptieve immuunsysteem tegelijk te analyseren. Hiermee kunnen we onderzoeken welke immuuncellen nog meer potentie hebben als targets voor immuuntherapie.

### **Dit proefschrift**

In dit proefschrift hebben we een uitgebreide karakterisatie van het immuuncel-infiltraat in colorectale (dikkedarm) kanker en alvleesklierkanker uitgevoerd. Colorectale kanker is de derde meest voorkomende vorm van kanker wereldwijd. Momenteel komen er per jaar 1,9 miljoen nieuwe gevallen van colorectale kanker bij, met naar schatting 935.000 sterfgevallen. Colorectale kanker is een heterogene ziekte waarbij verschillende subtypen worden onderscheiden aan de hand van hun genetische eigenschappen. Ongeveer 15-20% van de patiënten heeft het subtype microsatelliet instabiele (MSI) colorectale kanker. Dit subtype wordt gekarakteriseerd door vele honderden mutaties in de tumor door een defect in het DNA mismatch-repairsysteem (MMR-deficiënt). Mismatch-repair is een systeem in onze cellen waarmee fouten in het DNA hersteld kunnen worden. Bij een defect mismatch-repair systeem zullen er grote hoeveelheden mutaties ontstaan. Door deze grote hoeveelheid mutaties worden er waarschijnlijk veel antigenen aan het immuunsysteem gepresenteerd, wat leidt tot veel tumor-infiltrerende immuuncellen. Dit tumortype wordt ook wel 'immunogeen' genoemd. Daarentegen heeft het merendeel van de patiënten met colorectale kanker een microsatelliet stabiele (MSS) tumor met een normaal werkend DNA mismatch-repairsysteem (MMR-proficiënt). In vergelijking met MMR-deficiënte tumoren, vertoont dit subtype over het algemeen een lager aantal mutaties en een minder grote infiltratie van immuuncellen in de tumor. Het type colorectale kanker is gerelateerd aan de klinische prognose van de patiënten en de respons op immuuntherapie met checkpointremmers. MMR-deficiënte tumoren hebben over het algemeen een betere prognose dan MMR-proficiënte tumoren. Het is bekend dat immuuntherapie met checkpointremmers weinig of niet aanslaat bij MMR-proficiënte tumoren, maar wel effectief kan zijn bij een deel van de MMR-deficiënte tumoren. Een veel voorkomend ontsnapingsmechanisme van MMR-deficiënte colorectale kanker is de afschakeling van HLA-expressie. Hierdoor zouden MMR-deficiënte tumoren, in theorie, ongevoelig moeten zijn voor immuuntherapie met checkpointremmers. Deze vorm van immuuntherapie grijpt namelijk in op T-cellen in tumoren, die in dit geval de HLA-negatieve kankercellen niet (zouden moeten) kunnen herkennen. Verrassend genoeg reageert de meerderheid van HLA-negatieve, MMR-deficiënte colorectale kanker goed op immuuntherapie met checkpointremmers. Dit suggereert dat andere soorten immuuncellen bijdragen aan de respons op de immuuntherapie in deze tumoren. Hier zou een belangrijke rol weggelegd kunnen zijn voor ILCs, NK-cellen en  $\gamma\delta$  T-cellen, die kankercellen zonder HLA-expressie kunnen herkennen en elimineren.

Alveeskliekkanker is een van de meest dodelijke vormen van kanker. Het wordt vaak pas in een laat stadium ontdekt, waarbij slechts ongeveer 20% van de patiënten in aanmerking komt voor operatie. Vanwege de slechte prognose heeft alveeskliekkanker ongeveer evenveel gevallen (496.000) als sterfgevallen (466.000) per jaar wereldwijd. Alveeskliekkanker ontstaat door de stapsgewijze opeenstapeling van genetische veranderingen via niet-invasieve voorloperafwijkingen. Er zijn verschillende typen alveeskliekkanker. De meest voorkomende vorm van alveeskliekkanker ontstaat uit cellen van de alveeskliekgang. Dit type kanker heet ductaal adenocarcinoom, en hebben we in dit proefschrift bestudeerd. Alveeskliekkanker is niet-immunogeen en wordt gekenmerkt door een laag aantal mutaties, en weinig en vooral immuun-onderdrukkende immuuncellen. Defecten in DNA-repairsystemen zoals MMR-deficiëntie komen zelden voor in alveeskliekkanker (ongeveer in 1% van de gevallen). Tot op heden reageert alveeskliekkanker niet op behandeling met immuun checkpointremmers. Momenteel worden nieuwe vormen van immuuntherapie en combinaties van therapieën onderzocht om te proberen om de immunogeniteit van alveeskliekkanker te versterken, en daarmee de respons op immuuntherapie te verbeteren.

In **Hoofdstuk 2** beschrijven we hoe onze kennis over de rol van het immuunsysteem in kanker vergroot is door de opkomst van nieuwe, 'single-cell' technologieën zoals massa cytometrie en 'single-cell RNA-sequencing'. Deze technieken hebben wij toegepast in de experimenten die in dit proefschrift zijn beschreven om zo een beter beeld te krijgen van de immuuncellen die zich in de omgeving van de tumor bevinden.

In **Hoofdstuk 3** hebben we een gedetailleerde karakterisatie van het immuuncel-infiltraat in colorectale kanker, gezond colorectaal weefsel, lymfeklieren en bloed samples van patiënten uitgevoerd met massa cytometrie. We vonden dat cellen van zowel het aangeboren als het adaptieve immuunsysteem een belangrijke rol spelen bij de anti-tumor immuunreactie. Daarnaast werden nieuwe immuuncel-subsets gevonden die verhoogd aanwezig waren in MMR-deficiënte tumoren. Deze nieuwe subsets bestaan uit PD-1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-cellen en CD103<sup>+</sup> ILC1-achtige cellen, en laten cytotoxische activiteit zien in de tumoren. Ten slotte vonden we weefsel-residente, geactiveerde CD8<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup> T-cel populaties die specifiek aanwezig waren in tumoren en niet in gezonde weefsels van dezelfde patiënten. Deze observaties vormden de basis voor nieuwe onderzoeksvragen die we in **Hoofdstuk 4**, **Hoofdstuk 5**, en **Hoofdstuk 6** bestuderen.

In **Hoofdstuk 4** hebben we verder onderzocht hoe de PD-1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-cellen bijdragen aan de anti-tumor immuunrespons en aan het effect van immuuntherapie met checkpointremmers in MMR-deficiënte colorectale kanker. Tumoren voor en na behandeling met checkpointremmers werden geanalyseerd met een combinatie van genexpressie, massa cytometrie en functionele experimenten. We vonden dat in tumoren waarin de HLA-expressie afgeschakeld is, waardoor ze ongevoelig (zouden moeten) zijn voor CD8<sup>+</sup> T-cellen,  $\gamma\delta$  T-cellen een belangrijke rol spelen in de vernietiging van de kankercellen.

In **Hoofdstuk 5** analyseerden we het volledige spectrum van ILC subsets en hun functionele verschillen in MMR-deficiënte colorectale kanker door middel van 'single-cell RNA-sequencing' in combinatie met analyse van eiwitexpressies en transcriptiefactoren. We laten zien dat de meerderheid van de ILC-populatie in colorectale tumoren bestaat uit cytotoxische CD103<sup>+</sup> ILC1-achtige cellen, die een actieve rol lijken te spelen in de anti-tumor immuunrespons.

In **Hoofdstuk 6** hebben we de DNA-sequenties van de T-celreceptor van weefsel-residente, geactiveerde CD8<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup> T-cellen uit colorectale tumoren bepaald en vergeleken met die van T-cellen uit gezond colorectaal weefsel, lymfeklieren en bloed samples van dezelfde patiënten. Daarmee kregen we inzicht in waar de weefsel-residente, geactiveerde T-cellen in colorectale kanker vandaan komen, en of ze klonale expansie laten zien, een kenmerk van antigeen-specifieke T-celresponsen.

In **Hoofdstuk 7** onderzochten we immuuncel-populaties in alveesklierkanker, gezond alveesklierweefsel, lymfeklieren, milt en bloed samples van patiënten met massa cytometrie. We beschrijven een immuun-onderdrukkende omgeving rondom de tumor met weinig cytotoxische T-cellen en veel B cellen en regulatoire T-cellen ten opzichte van gezond alveesklierweefsel. Daarnaast vonden we een CD103<sup>+</sup> ILC1-achtige populatie in alveeskliertumoren die lijkt op de populatie die we gevonden hebben in colorectale tumoren (**Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 5**). Een unieke invalshoek van deze studie was de inclusie van immuuncellen geïsoleerd uit de poortader, waar we een verhoogde aanwezigheid van tumor-geassocieerde immuuncellen zagen.

In **Hoofdstuk 8** bespreken we de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift in een breder perspectief en geven we implicaties voor verder onderzoek en de klinische praktijk.

### Conclusie en toekomstperspectief

In dit proefschrift hebben we de complexiteit van het immuunsysteem in colorectale kanker en alveesklierkanker blootgelegd met massa cytometrie en 'single-cell RNA-sequencing'. Terwijl de meeste studies zich focussen op de rol van conventionele T-cellen in de ontwikkeling en progressie van kanker, hebben wij een gedetailleerde karakterisatie van immuuncellen van zowel het aangeboren als het adaptieve immuunsysteem uitgevoerd in tumoren en gezonde weefsels van patiënten. We vonden dat naast conventionele T-cellen,  $\gamma\delta$  T-cellen (in colorectale kanker) en ILCs (in colorectale kanker en alveesklierkanker) een belangrijke rol spelen bij de anti-tumor immuunreactie. In colorectale kanker waren deze immuuncel-subsets verhoogd aanwezig in MMR-deficiënte tumoren die vaak afschakeling van HLA-expressie laten zien, en daardoor ongevoelig (zouden moeten) zijn voor herkenning en vernietiging door CD8<sup>+</sup> T cellen. Aan de hand van het eiwit en genetisch profiel van de immuuncellen, en met behulp van functionele experimenten, zagen we dat ze een actieve rol spelen in de herkenning en vernietiging van de kankercellen (zie **Figuur 1, Hoofdstuk 8**). Op basis van onze eigen bevindingen, maar ook de bevindingen van anderen, voorzien we een belangrijke rol voor  $\gamma\delta$  T-cellen en ILCs als effector cellen voor immuuntherapie. Verdere



studies zullen zich richten op de werking en potentie van deze subsets als immuuntherapie bij kanker. Deze resultaten zijn belangrijk, omdat momenteel maar een kleine groep van de patiënten met kanker baat heeft bij immuuntherapie. Het benutten van de anti-tumor reactiviteit van  $\gamma\delta$  T-cellen en ILCs zou het succes van immuuntherapie bij kanker kunnen verbeteren.

In de toekomst is het belangrijk om niet alleen de rol van het immuunsysteem in primaire tumoren te bestuderen, zoals beschreven in dit proefschrift, maar ook de rol van het immuunsysteem bij uitzaaiingen van kanker. De meerderheid van de patiënten met kanker overlijdt aan de gevolgen van uitzaaiingen. Om de vooruitzichten van patiënten met gevorderde kanker te verbeteren, is het belangrijk om de rol van immuuncellen van het aangeboren en adaptieve immuunsysteem bij uitzaaiingen te onderzoeken, en om in kaart te brengen hoe de omgeving van uitzaaiingen verschilt van die van de primaire tumor (zie **Figuur 2, Hoofdstuk 8**). Tijdens de verspreiding van kankercellen via het bloed of lymfe, worden de kankercellen blootgesteld aan verschillende soorten bindweefselcellen en immuuncellen. Vervolgens moeten de kankercellen zich aanpassen aan de nieuwe omgeving op de plek van de uitzaaiing. De aanwezigheid van andere soorten immuuncellen in de omgeving van de uitzaaiing en wellicht andere immuun ontsnappingsmechanismen ten opzichte van de primaire tumor kan van invloed zijn op het effect van immuuntherapie. Het is daarom belangrijk om meer inzicht te krijgen in de immuuncellen rondom uitzaaiingen, en hoe deze kunnen worden aangepakt met immuuntherapie.

De resultaten van dit proefschrift zijn in verschillende wetenschappelijke tijdschriften gepubliceerd. Dit proefschrift is tot stand gekomen dankzij samenwerkingen tussen verschillende onderzoeksgroepen onder leiding van Frits Koning (Immunologie, LUMC), Noel de Miranda (Pathologie, LUMC), Boudewijn Lelieveldt (Radiologie, LUMC en TU Delft), Ahmed Mahfouz (Humane Genetica, LUMC en TU Delft) en Emile Voest (Moleculaire Oncologie en Immunologie, NKI).