

## SAMENVATTING

Het hoofd-hals plaveiselcelcarcinoom (HHPCC) ontstaat uit de mucosale oppervlakte van de bovenste aerodigestieve kanaal. Ondanks recente verbeteringen in chirurgische technieken en doelgerichte behandelmethodes, zijn de behandelresultaten nauwelijks verbeterd en 40-50% van de patiënten ontwikkelt lethale recidieven en/of metastasen. Kenmerkend voor HHPCC is de lokale invasie in het, vaak functioneel belangrijke, zachte weefsel van het hoofd en de hals. Daarom zijn de resectiemarges na een chirurgische behandeling vaak ontoereikend en / of zijn de functionele gevolgen van de behandeling aanzienlijk. Ontoereikende marges vereisen extra chirurgie of postoperative (chemo-) radiotherapie, wat bijdraagt aan de toxiciteit van oncologische behandelingen en de impact ervan op de kwaliteit van leven. Om de behandeling van deze kanker te verbeteren is het dus van belang de basis van tumorcel invasie in HHPCC te begrijpen en om de uitkomst van de chirurgische behandelingen te verbeteren.

Analyse van HHPCC tumoren heeft de signaaltransductie van groeifactoren en cytokines geïdentificeerd als potentieel doelwit die bijdragen aan carcinogenese en invasie. Ze werken op transcriptionele programma's zoals de epitheliale-mesenchymale transitie (EMT) en kunnen zo alle bekende vormen van celmigratie induceren. Dit zijn zowel de individuele celbewegingen, waarbij er geen interactie is met naburige cellen, als collectieve migratie, waarbij cellen zich verplaatsen als cohesieve groepen met intacte cel-cel contacten. Naast het induceren van invasie, kunnen groeifactoren en cytokinen ook een conversie van de strategie van tumorcel verspreiding veroorzaken, hetgeen de plasticiteit van invasie wordt genoemd. Hoe de plasticiteit van invasie echter spatiotemporeel wordt gecontroleerd door de micro-omgeving van de tumor en of het remmen van deze factoren de voortgang van de plasticiteit kan remmen, blijft onduidelijk.

Een algemene inleiding en schets van de scriptie worden gegeven in **Hoofdstuk 1**.

In **Hoofdstuk 2** worden de huidige concepten en functionele consequenties van de signaaltransductie van groeifactoren en cytokines gegroepeerd in functionele "modules" die bepalend zijn in de keuze tussen een individueel, of een collectief invasieprogramma. We onderscheiden hier de invloed op celmatrix adhesie, cel-cel interactie, cytoskelet dynamiek en remodelering van de extracellulaire matrix op basis van goed gedocumenteerde voorbeelden. Dit hoofdstuk beschrijft verder hoe individuele en gecombineerde effecten van groeifactoren en cytokines cellen kunnen herprogrammeren en zo de plasticiteit van kankerinvasie veroorzaken. Om de mechanismen van de plasticiteit van invasie en potentiële interventiepunten beter te begrijpen, is het combineren van op cellen gebaseerde *in vitro* analyse, preklinische muismodellen, klinische studies en mathematische modellering noodzakelijk. Zo kan in de toekomst door specifieke therapie de uitkomst verbeterd worden.

Groeifactoren en cytokines worden geproduceerd door fibroblasten die zich in de tumor omgeving bevinden. **Hoofdstuk 3** beschrijft hoe er met behulp van een 3D-collageen-sferoïde invasie test wordt gedemonstreerd dat de aanwezigheid van fibroblasten zowel collectieve als enkelvoudige celmigratie in HHPCC cellen bewerkstelligt. We identificeren Hepatocyte groeifactor

(HGF) als de belangrijkste factor waarmee fibroblasten de migratie van HHPCC cellen reguleert en laten zien dat toenemende concentraties van fibroblast geconditioneerd medium, HGF of epidermale groeifactor (EGF), een overgang van collectief naar individuele celmigratie induceert. De meeste individueel migrerende cellen ontwikkelden amoëboïde migratie. Echter, deze cellen waren nog steeds in staat om collageen af te breken, en waren voor migratie afhankelijk van matrix-metalloproteïnasen, wat ongebruikelijk is voor amoëboïde migratie. Om de biochemische analyse van volledige celpopulaties aan te vullen, werd een nieuwe 3D-celcytometrie ontwikkeld om moleculaire markers van EMT in subsets van tumorcellen te detecteren. Zowel collectieve als individuele invasiegebieden brachten de mesenchymale marker vimentine tot expressie met een frequentie van ongeveer 20 tot 80%, afhankelijk van de cellijn. Remming van de HGF signaal-transductie route elimineerde de verspreiding van individuele cellen en verminderde collectieve invasie, wat een verschil in gevoeligheid voor gerichte interventie aangeeft. HGF induceert dus EMT samen met collectieve, proteolytisch-amoëboïde en somsmesenchymale invasie, wat EMT aanduidt als een mogelijk moleculair programma dat betrokken is bij elke invasiestrategie.

Fluorescentie gestuurde chirurgie (FGS) met als doel de tumormarge te identificeren is de meest veelbelovende strategie ter verbetering van routine klinische chirurgie. Tijdens FGS worden tumor-specifieke antilichamen geconjugeerd met een nabij-infrarood fluorofoor en intraveneus geïnjecteerd. Zij accumuleren in de tumor laesie en kunnen worden gevisualiseerd met behulp van een intraoperatief beeldvormingssysteem. Tumor-specifieke antilichamen en detectiestrategieën zijn echter nog in ontwikkeling en door het combineren van fluorescentie met bijvoorbeeld CO<sub>2</sub> laserchirurgie, kunnen fluoroforen verbleken en het signaal uitdoven. Daardoor is het belangrijk de effectiviteit van CO<sub>2</sub> laserchirurgie in combinatie met FGS te onderzoeken.

Op basis van een literatuuronderzoek naar potentiële oppervlaktemoleculen gevolgd door immunohistochemische en functionele validatie, identificeren wij in **Hoofdstuk 4** CD44v6 als antigeen dat op betrouwbare wijze tot expressie wordt gebracht in de invasiezone van HHPCC tumoren. Monoklonaal anti-CD44v6 antilichaam BIWA werd gebruikt voor nabij-infrarood fluorescentiedetectie in een reeks menselijke HHPCC cellen en een lokaal invasief tumor muismodel. BIWA detecteerde nauwkeurig menselijke HHPCC xenotransplantaten in muizen met een uitstekende signaal - ruis verhouding en lage opname in het weefsel rond de tumor en andere organen. Dit was voldoende om tumorgedeelten kleiner dan 1 mm, bestaande uit een paar duizend cellen, onder klinische condities zichtbaar weer te geven. De gegevens duiden aan dat CD44v6 een geschikt doelwit is voor betrouwbare detectie van invasieve regio's in HHPCC tumoren *in vivo*.

In **Hoofdstuk 5** laten wij zien dat de bestraling door de CO<sub>2</sub> laser *in vitro* niet significant interfereert met het fluorescentiesignaal in het zichtbare en nabij-infrarode lichtspectrum. Verder waren specifieke fluorescentiesignalen in een FGS muismodel 1000 keer sterker dan door laser geïnduceerde auto-fluorescentie in muizenweefsel. Deze bevindingen duiden op compatibiliteit van CO<sub>2</sub> laserchirurgie en FGS.

**Hoofdstuk 6** bespreekt de relevantie van celinvasie strategieën voor de verspreiding van lokale tumorcellen, de uitdagingen van de plasticiteit van tumorcelmigratie bij de behandeling van kanker en perspectieven voor het doelgericht bestrijden van kanker door chirurgische en moleculaire therapie.