

Nederlandse samenvatting

Transcriptomics van hoofd-halskanker: profileren van tumor biologie voor de respons op chemoradiotherapie.

Patiënten met hoofd-halskanker (HHC) presenteren zich vaak in een gevorderd stadium van de ziekte. Ze hebben een slechte prognose met een 5-jaarsoverleving van ongeveer 50%. Gevorderde orofarynx-, hypofarynx- of larynxcarcinomen worden vaak behandeld met orgaansparende chemoradiotherapie op basis van cisplatinum. Chirurgie is een invasieve en geen orgaan sparend alternatief. Om patiënten in aanmerking te laten komen voor alternatieve behandelingen is het identificeren van patiënten waarbij de behandeling waarschijnlijk niet aanslaat noodzakelijk. Biomarkers kunnen helpen bij het selecteren van patiënten die een hoog risico lopen op falen van de behandeling. Een reeds bekende biomarker is infectie met het humaan papillomavirus (HPV). Tumoren die het gevolg zijn van een eerdere HPV-infectie (HPV-positieve tumoren) hebben een goede prognose in vergelijking met HPV-negatieve tumoren. De nood voor prognostische biomarkers is dan ook vooral groot bij HPV-negatieve HHC. Het DESIGN-consortium is samengebracht om biomarkers te identificeren om de respons te voorspellen op chemoradiotherapie in HPV-negatieve orofaryngeale, hypofaryngeale en laryngeale HHC-patiënten in een gevorderd stadium. Dit multicenter consortium bestaat uit het AmsterdamUMC, het Nederlands Kanker Instituut/Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis, het UMC Utrecht, de MAASTRO kliniek en de Universiteit van Maastricht. Ieder kliniek had zijn eigen expertise. In het Antoni van Leeuwenhoek, en het onderwerp van dit proefschrift, hebben we de gezocht naar de prognostische impact van genetische en transcriptoom biomarkers voor deze patiënten groep. Dit proefschrift maakt gebruik van bulk-RNA-sequencing data. Machine learning technieken werden gebruikt om modellen te genereren die de biologie van hoofd-halskanker omvatten. De prognostische impact van deze modellen, en daarmee de onderliggende tumorbiologie, werden onderzocht.

In **hoofdstuk 2** gaan we dieper in op een bekende prognostische biomarker in HHC, hypoxie. Hypoxische tumoren hebben een slechtere prognose in vergelijking met meer normoxische tumoren. Tumorcellen kunnen hypoxisch worden door chronische en acute mechanismen. Momenteel zijn er vier klinische hypoxie profielen op basis van RNA gen expressie. Het is onduidelijk wat hun onderlinge relaties zijn en hoe ze verband houden met chronische en acute hypoxie. We wilden ook de klinische impact van acute en chronische hypoxie bepalen in verschillende datasets.

De vier klinische hypoxieprofielen vertoonden weinig overlap in de genen die voor elk profiel werden gebruikt. Door drie initiële datasets te combineren, met in totaal 224 HPV-

patiënten, toonden analyses van de vier klinische hypoxieprofielen aan dat de profielen sterk gecorreleerd zijn met elkaar en met chronische hypoxie. De vier klinische profielen werden gemiddeld om een gezamenlijke chronische hypoxiescore te construeren. In een subgroep van 91 patiënten, HPV-positieve en -negatieve tumoren, was chronische hypoxie, hoewel niet significant, geassocieerd met lokaal recidief, en acute hypoxie was significant geassocieerd met lokale controle. Analyse in aanvullende set van 174 HPV-negatieve HHC behandeld met chemoradiotherapie bevestigde deze bevindingen. Univariabele analyses toonden aan dat acute hypoxie significant geassocieerd was met algehele overleving, progressievrije overleving, lokale en locoregionale controle. Chronische hypoxie was significant geassocieerd met progressievrije overleving en vertoonde een algemene overlevingstrend, maar niet met locoregionale controle. Patiënten met hoge scores van zowel acute en chronische hypoxie hadden de slechtste overall survival en lokale controle. Multivariabele analyse, in een beperkte subgroep van 149 patiënten, laat zien dat acute hypoxie significant geassocieerd is met algehele overleving, progressievrije overleving, lokale controle en locoregionale controle. Chronische hypoxie was niet geassocieerd met hypoxie in dit cohort.

In **hoofdstuk 3** richten we ons op epitheel-naar-mesenchymale transitie (EMT), een minder bekende biomarker in HHC. EMT is het proces waarbij epitheelcellen mesenchymale kenmerken krijgen. EMT is in verband gebracht overleving bij veel andere soorten kanker, maar er is weinig wetenschappelijk bewijs in HHC. Om de impact van EMT in HHC te bepalen, hebben we zeven EMT gen expressie profielen geëxtrapoleerd die oorspronkelijk waren gemaakt voor andere kanker soorten. We hebben deze zeven profielen toegepast in een training set van 98 patiënten met gevorderde HPV-negatieve HHC van laryngeale, oro- en hypofaryngeale oorsprong, behandeld met op cisplatinum gebaseerde chemoradiotherapie. Alle zeven EMT-profielen vertoonden associaties met algehele overleving, progressievrije overleving en metastasevrije overleving in de training set. Door de meest epitheliale en meest mesenchymale tumoren uit onze dataset te vergelijken en machine learning te gebruiken, hebben we een nieuw HHC-specifiek EMT-model gemaakt. De impact op de uitkomst van de zeven niet-HHC-specifieke modellen en het HHC-EMT-model werd bevestigd in de validatieset, die bestond uit 78 patiënten met identieke in- en exclusiecriteria. Sterke associaties met EMT werden gezien in de algehele overleving en progressievrije overleving. In de validatie set was EMT echter niet geassocieerd met metastasevrije overleving, maar met locoregionale controle. Om het eerder gesuggereerde verband tussen metastase op afstand en EMT te onderzoeken, analyseerden we aanvullende primaire tumoren van patiënten die zich voor het eerst presenteerden met gemetastaseerde HHC. De primaire

tumor van patiënten met gemetastaseerde ziekte vertoonde hoge waarden in het HHC-EMT model, wat wijst op een associatie met EMT. Multivariabele analyses met TNM-stadium in beide cohorten toonden aan dat het HHC-EMT-model significant geassocieerd is met algehele en progressievrije overleving. Een hoge HHC-EMT was gecorreleerd met tumoren in het T4-stadium en met een sprieterig groeipatroon. Ten slotte suggereerde de literatuur dat het EMT-signaal bij bulk-RNA-sequencing kan worden toegeschreven aan kanker-geassocieerde fibroblasten. We konden deze bevinding niet bevestigen. Met behulp van immunohistochemische kleuring voor vimentin konden we de HHC-EMT-modelscores niet correleren met stroma aanwezigheid. Deze studie toonde aan dat EMT geassocieerd is met de uitkomst bij HHC-patiënten in een gevorderd stadium die worden behandeld met chemoradiotherapie.

Defecten in DNA-crosslink reparatie zijn frequente manifestaties bij HHC en zijn in verband gebracht met overleving bij veel soorten kanker. In **hoofdstuk 4** hebben we modellen gegenereerd om tumoren met defecten in DNA-crosslink reparatie te identificeren en te bepalen wat de klinische impact is. Met behulp van RNA-sequencing data van cellijnen en hun gevoeligheid voor mitomycine C en olaparib, hebben we met gebruik van machine learning technieken modellen gemaakt. Gevoeligheid voor, olaparib en mitomycine C, werd gebruikt als een proxy voor functionele defecten in DNA-crosslink reparatie. Verschillende genselectiemethoden en machine learning technieken werden gecombineerd in modellen om te voorspellen welke cellijnen defecten in DNA-crosslink reparatie hadden. Kruisvalidatie werd gebruikt om de robuustheid van de gebruikte methoden te meten. Vervolgens hebben we de best presterende modellen getest in verschillende datasets. In het Cancer Genome Project (CGP) zijn verschillende HHC-cellijnen onderworpen aan veel verschillende medicatie. In de HCC-cellijnen van de CGP correleerden de modellen goed met mitomycine C IC50-waarden en de modellen voorspelde mutaties in DNA-crosslink-reparatie genen correct. In een aparte dataset voorspelden de modellen de knockdown van DNA-crosslink reparatie genen. Dit bevestigde dat de modellen cellen met defecten in DNA-crosslink reparatie konden identificeren. Vervolgens evalueerden we de impact van de modellen op de klinische uitkomst in twee datasets van HPV-negatieve HHC-patiënten in een gevorderd stadium die werden behandeld met chemoradiotherapie. Tumoren met defecten in DNA-crosslink reparatie, zoals geassocieerd door de modellen, vertoonden een trend naar een slechtere algehele overleving in beide cohorten. De slechte prognose-associatie was bijzonder sterk in normoxische tumoren en was gekoppeld aan een verhoogd risico op metastasen op afstand. Daaropvolgende analyses toonden aan dat de effecten van hypoxie en DNA-reparatiedefecten elkaar gedeeltelijk overlappen. Dit kan het verschil in uitkomst

van de modellen tussen normoxische en hypoxische tumoren verklaren. De associatie van onze modellen met metastase op afstand bracht ons ertoe om terug te gaan naar *in vitro* studies om hun migratiemogelijkheden te onderzoeken. In scratch- en transwell-assays bleken HHC-cellijnen met defecten in DNA-crosslink-reparatie meer te migreren en waren ook meer invasief. Concluderend zijn de modellen in staat om deficiëntie van DNA-crosslink reparatie te identificeren in HHC. Defecten in DNA-crosslink reparatie, volgens de modellen, zijn geassocieerd met een slechte prognose voor HHC patiënten behandeld met chemoradiotherapie.

Om de verbanden tussen de bovengenoemde biomarkers en in de literatuur gepubliceerde biomarkers te beoordelen, hebben we een validatiestudie verricht die de beschikbare gegevens combineert met de belangrijkste biomarkers (hypoxie (chronisch en acuut), proliferatie, DNA-herstel, stamcelmarkers (SLC3A2 en CD44), EMT, EGFR en immuun (T-cel infiltratiescore, CD8+ T-cellen, CD56dim natural killer en CD8+ versus T regulerende celverhoudingen)) en hun impact op respons op radiotherapie. In **hoofdstuk 5** hebben we de onderlinge relaties tussen deze biomarkers en hun klinische impact op locoregionale controle getest als marker voor respons op radiotherapie. Hiervoor hebben we een RNA sequencing dataset gebruikt van 197 patiënten met gevorderde HPV-negatieve HHC die werden behandeld met op cisplatinum gebaseerde chemoradiotherapie. Er werden sterke correlaties waargenomen tussen de stamcelmarkers en tussen acute hypoxie en T-celinfiltratiescore, CD8+ T-celabundantie en proliferatiescores. Een 10.000-voudige bootstrapping-methode met meerdere klinische variabelen werd gebruikt om robuuste grenswaarden voor elke marker te bepalen. Chronische en acute hypoxie, EGFR-expressie en markers van stamcellen waren het sterkst geassocieerd met locoregionale controle in multivariabele analyses met alleen klinische variabelen. Multivariabele analyse, rekening houdend met zowel andere biologische als klinische markers, toonde een significante rol aan voor chronische hypoxie, EGFR-expressie, CD8+/Treg cel verhoudingen en T-cel infiltratie bij locoregionale controle. In tegenstelling tot locoregionale controle, wordt metastase op afstand voornamelijk beïnvloed door EMT-, EGFR- en CD8+- versus T-reg cel verhoudingen. Deze externe validatie ondersteunt de relevantie van biologische factoren bij het bepalen van de uitkomst van chemoradiotherapie bij HHC.

Hoofdstuk 6 sluit dit proefschrift af met een algemene discussie, waarin onze bevindingen worden beschreven in relatie tot recente literatuur. Uitdagingen worden ook beschreven en we sluiten af met toekomstperspectieven voor het biomarkeronderzoek in HHC.

