

Academiejaar 2012-2013



Faculteit Farmaceutische, Biomedische en Diergeneeskundige wetenschappen

Onderwijscommissie Biomedische Wetenschappen

Onderzoek naar het onderliggende mechanisme van verworven resistentie tegen EGFR-targeting antilichamen in hoofdhalscarinomas.

Door:

Lina Blockx

Masterproef voorgelegd tot het behalen van de graad van
Master in de Biomedische wetenschappen

Promotor: Prof. dr. Filip Lardon

Copromotor: dr. ir. Marc Baay

Begeleider: Carolien Boeckx

Laboratorium voor Kankeronderzoek en Klinische Oncologie

Centrum voor Oncologisch Onderzoek (CORE)

Universiteit Antwerpen, Campus Drie Eiken

Universiteitsplein 1

2610 Wilrijk

Inhoud	
Samenvatting	3
Abstract	4
Lijst met gebruikte afkortingen	5
1. Inleiding	6
1.1. Kanker	6
1.1.1. Eigenschappen van kanker	6
1.1.2. Epitheliale-mesenchymale transitie (EMT)	8
1.2. Hoofdhalskanker	9
1.2.1. Risicofactoren	10
1.2.2. Huidige therapie	10
1.2.3. Pathogenese	11
1.3. Epidermale groeifactor receptor (EGFR)	12
1.4. Doelgerichte therapie	14
1.4.1. Resistentie tegen doelgerichte therapie	15
1.5. Heparine-bindende epidermale groeifactor (HB-EGF)	17
1.6. Disintegrine en metalloproteïnase (ADAM)	18
1.7. Interleukine-8 (IL-8)	19
2. Hypothese en doelstellingen	20
3. Materiaal en methoden	21
3.1. Cellijnen	21
3.1.1. Resistentie opwekken en in stand houden in de cellijnen	21
3.2. Celcultuur	21
3.2.1. Kweekomstandigheden	21
3.2.2. Bereiden celsuspensies en passeren van cellen	21
3.3. Compounds	22
3.3.1. Cetuximab	22
3.3.2. HB-EGF antilichaam	22
3.3.3. ADAM inhibitor (GM 6001)	22
3.4. xCELLigence	22
3.4.1. Principe	23
3.4.2. Protocol proliferatietesten	23
3.4.3. Protocol cytotoxiciteitstesten	23
3.4.3.1. Combinatietherapie HB-EGF antilichaam en cetuximab	24
3.4.3.2. GM 6001 in mono- en combinatietherapie met cetuximab	24
3.5. Transwell	24
3.5.1. Principe	24

3.5.2.	Protocol migratie	25
3.6.	Statistiek	25
3.6.1.	Migratietesten	25
3.6.2.	Cytotoxiciteitstesten	26
4.	Resultaten.....	27
4.1.	Migratietesten.....	27
4.1.1.	SC263R en SC263S	27
4.1.2.	LICR-HN2R en LICR-HN2S	28
4.1.3.	LICR-HN5R en LICR-HN5S	28
4.2.	Proliferatietesten	29
4.2.1.	SC263R.....	29
4.2.2.	LICR-HN2R.....	30
4.2.3.	LICR-HN5R.....	30
4.3.	Cytotoxiciteitstesten.....	31
4.3.1.	HB-EGF antilichaam	31
4.3.1.1.	SC263R, LICR-HN2R en LICR-HN5R	31
4.3.2.	ADAM inhibitor (GM 6001)	32
4.3.2.1.	SC263R	32
4.3.2.2.	LICR-HN2R	33
Discussie		35
Conclusie		38
Dankwoord		39
Referenties		40

Samenvatting

Hoofdhalskanker kent met 6% van alle gediagnosticeerde tumoren een hoge incidentie bij mannen. Ook bij vrouwen ligt de incidentie van hoofdhalstumoren relatief hoog (2,1%). Bovendien kent hoofdhalskanker een hoge mortaliteit, zowel bij mannen als bij vrouwen (respectievelijk 3,8% en 1,4% van alle kankergerelateerde overlijdens). Van alle hoofdhalstumoren zijn meer dan 90% squameuze hoofdhalscarinomas (HNSCC). Deze tumoren ontstaan uit de epitheellaag van de mondholte, de neusholte, de farynx, de larynx, de speekselklieren en de paranasale sinussen. De huidige therapie voor HNSCC, die voornamelijk bestaat uit chirurgie, radio- en chemotherapie, voorkomt niet dat in 20% tot 30% van de gevallen vorming van metastasen of hervall optreedt. Onderzoek heeft aangetoond dat de epidermale groeifactorreceptor (EGFR) in meer dan 90% van de HNSCC verhoogd tot expressie komt. Hierdoor werden twee types doelgerichte therapie tegen EGFR ontwikkeld, namelijk monoklonale antilichamen en tyrosine kinase inhibitoren. Cetuximab, een monoklonaal antilichaam gericht tegen het extracellulair domein van EGFR, is het enige anti-EGFR therapeuticum dat een FDA en EMEA goedkeuring heeft voor het gebruik in de klinische praktijk. Toch zijn de klinische effecten van cetuximab vrij bescheiden wat duidt op de aanwezigheid van resistentie. In deze thesis wordt gefocust op verworven resistentie, welke optreedt na langdurige behandeling met het therapeuticum.

In voorgaand onderzoek werd een verhoogde expressie waargenomen van het ligand HB-EGF, het cytokine IL-8 en het peptidase ADAM 19 in cetuximab-resistente cellijnen. Mogelijks zijn deze factoren betrokken bij de ontwikkeling van verworven resistentie. Deze verworven resistentie kan verkregen worden door activatie van ADAM 19 door IL-8. Hierdoor wordt HB-EGF gekliefd en kan het binden aan EGFR waardoor de EGFR signalisatie behouden blijft ondanks EGFR-doelgerichte therapie.

In eerste instantie werd de cytotoxiciteit van cetuximab in combinatie met een neutraliserend antilichaam tegen sHB-EGF nagegaan. Hieruit bleek dat het neutraliserend antilichaam tegen sHB-EGF de cytotoxiciteit van cetuximab niet verhoogde. Vervolgens werd de klieving van HB-EGF geïnhibeerd met GM 6001, een ADAM inhibitor, en dit in combinatie met cetuximab. Deze voorlopige experimenten toonden aan dat de inhibitor de cytotoxiciteit van cetuximab slechts in beperkte mate verbeterde. Daarnaast werd onderzocht of cetuximab-resistente cellijnen een hogere migratoire capaciteit bezitten dan cetuximab-gevoelige cellijnen. Uit deze onderzoeken bleek dat cetuximab-resistente cellijnen die een verhoogde expressie van HB-EGF vertonen een hogere migratoire capaciteit bezitten. Naarmate vimentine meer tot expressie komt in de cellijn, is het verschil in migratoire capaciteit duidelijker.

Uit deze thesis kan besloten worden dat HB-EGF mogelijk een rol speelt in de ontwikkeling van cetuximab-resistentie aangezien cellen met een verhoogde expressie van HB-EGF een verhoogde migratoire capaciteit bezitten, wat bijdraagt tot de ontwikkeling van resistentie. De cytotoxiciteitstesten met het neutraliserend antilichaam tegen sHB-EGF tonen aan dat sHB-EGF niet betrokken is bij de ontwikkeling van cetuximab-resistentie. Dit sluit echter niet uit dat HB-EGF kan bijdragen aan de resistentie aangezien HB-EGF gekliefd wordt in sHB-EGF en HB-EGF-CTF, wat achterblijft in de cel en naar de nucleus kan migreren. Blokkade van de klieving van HB-EGF door toediening van een ADAM inhibitor resulteerde in een relatief bescheiden effect van de inhibitor. Deze resultaten zijn echter zeer voorlopig; deze experimenten moeten herhaald worden om het effect van de inhibitor na te gaan.

Abstract

The incidence of head and neck cancer is relatively high with 6% of all the diagnosed tumors in men and 2.1% in females. Furthermore, head and neck cancer has a high mortality, in both males and females (3.8% and 1.4% of all cancer-related deaths, respectively). More than 90% of all the head and neck tumors arise from the epithelial layer of the oral cavity, the nasal cavity, the pharynx, the larynx, the salivary glands and the paranasal sinuses and are classified as head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). The current conventional treatment strategies, including surgery, radio- and chemotherapy, still result in 20% to 30% of the patients developing metastases or relapse in 20% to 30% of the patients, underscoring the need for new approaches to treat this malignancy. As the epidermal growth factor receptor (EGFR) has an increased expression in more than 90% of all the HNSCC and initiates important signaling pathways, two types of EGFR targeted therapy were developed, namely monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. Cetuximab, a monoclonal antibody against the extracellular domain of EGFR, is the only anti-EGFR therapeutic agent that has been approved by EMEA and FDA for clinical use in HNSCC. Yet the clinical effects of cetuximab are relatively modest, indicating the existence of resistance. This thesis focuses on acquired resistance, which occurs after a long-term treatment with the targeted agent.

Previously, we observed an increased expression of the ligand HB-EGF, the cytokine IL-8 and the peptidase ADAM 19 in cetuximab-resistant cell lines. Aberrant expression of these factors might contribute to the development of acquired resistance. We hypothesized that this acquired resistance is the result of ADAM 19 activation by IL-8, resulting in the release of HB-EGF by cleavage. The ligand HB-EGF is able to bind and activate EGFR and HER4, resulting in sustained EGFR signaling despite EGFR inhibition.

In this study, the cytotoxicity of cetuximab in combination with a neutralizing antibody against sHB-EGF was investigated in cetuximab-resistant cell lines. However, these results did not show any benefit of adding a sHB-EGF neutralizing antibody to cetuximab. Therefore, the cleavage of HB-EGF was inhibited by using an ADAM inhibitor GM 6001 in combination with cetuximab. Preliminary results indicate that GM 6001 has only modest effects in cetuximab-resistant cell lines. Furthermore, we also evaluated the migratory capacity of cetuximab-resistant cell lines compared with cetuximab-sensitive cell lines. These results showed that cetuximab-resistant cell lines have a higher migratory capacity compared with their sensitive counterpart, which is in agreement with the vimentine expression level.

To conclude, cetuximab-resistant cell lines have a higher migratory capacity compared to cetuximab-sensitive cell lines. However, we were not able to overcome cetuximab resistance by adding a neutralizing sHB-EGF antibody to cetuximab therapy. Conversely, this does not exclude the involvement of HB-EGF in resistance, since HB-EGF is cleaved in sHB-EGF and HB-EGF-CTF, the latter remains in the cell and can translocate to the nucleus. Blocking of the cleavage of HB-EGF by administration of an ADAM inhibitor resulted in a modest improvement of the cetuximab resistance. In the future, these experiments have to be repeated to obtain more coherent results.

Lijst met gebruikte afkortingen

Afkorting	Engelse vertaling	Nederlandse vertaling
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase	Disintegrine en metalloproteinase
AR	Amphiregulin	Amfireguline
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosinetriofosfaat
Bcl6	B-cell lymphoma 6	B-cel lymfoma 6
BTC	Betacellulin	Betacelluline
CI	Cell index	Celindex
CDKI	Cycline-dependent kinase inhibitor	Cycline-afhankelijke kinase inhibitor
CXCL	Cysteine-X-cysteine chemokines	Cysteine-X-cysteine chemokines
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxide
ECM	Extracellular matrix	Extracellulaire matrix
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Epidermale groeifactor receptor
EGFRvIII	EGFR variant III	EGFR variant III
EMA	European medicines agency	Europees geneeskunde agentschap
EMT	Epithelial mesenchymal transition	Epitheliale-mesenchymale transitie
EPR	Epiregulin	Epireguline
FBS	Fetal bovine serum	Foetaal kalfs serum
FDA	Food and drug administration	Voedsel en drug administratie
FGFR	Fibroblast growth factor receptor	Fibroblast groeifactor receptor
GPCR	G-protein coupled receptor	G-proteïne gekoppelde receptor
HB-EGF	Heparin-binding epidermal growth factor	Heparine-bindende epidermale groeifactor
HB-EGF-CTF	HB-EGF carboxy-terminal fragment	HB-EGF carboxy-terminaal fragment
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma	Squameus hoofdhalscarinoom
HPV	Human papillomavirus	Humaan papillomavirus
IC	Inhibitory concentration	Inhiberende concentratie
IGF-1R	Insuline-like growth factor receptor 1	Insuline gerelateerde groeifactor receptor 1
IgG1	Immunoglobulin G1	Immunoglobuline G1
IL-8	Interleukin-8	Interleukine-8
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Mitogeen geactiveerd eiwit kinase
MMP	Matrix metalloproteinase	Matrix metalloproteinase
NF-κB	Nuclear factor-κB	Nucleaire factor-κB
NRG	Neuregulin	Neureguline
nSF	Non serum free	Niet serumvrij
PBS	Phosphate buffered saline	Fosfaat gebufferde zoutoplossing
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerase kettingreactie
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase	Fosfoinositide-3-kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate	Fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfaat
PKC	Protein kinase C	Proteïne kinase C
PLCγ	Phospholipase C γ	Fosfolipase C γ
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc finger protein	Promyelocytair leukemische <i>zinc finger</i> eiwit
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	Fosfatase en tensine homolog
qRT-PCR	Real time reverse transcriptase PCR	Real time reverse transcriptase PCR
RB	Retinoblastoma protein	Retinoblastoma eiwit
RER	Rough endoplasmatic reticulum	Ruw endoplasmatisch reticulum
RTCA	Real-time cell analysis	<i>Real time</i> cel analyse
RTK	Receptor tyrosin kinase	Receptor tyrosine kinase
SF	Serum free	Serumvrij
SH	Src-homology	Src-homologie
sHB-EGF	Soluble HB-EGF	Oplosbaar HB-EGF
STAT	Signal transducers and activators of transcription	Signaaltransducers en activatoren van transcriptie
TACE	TNFα- converting enzyme	TNFα converterend enzym
TGF-α	Transforming growth factor α	Transformerende groeifactor α
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Vasculaire endotheliale groeifactor

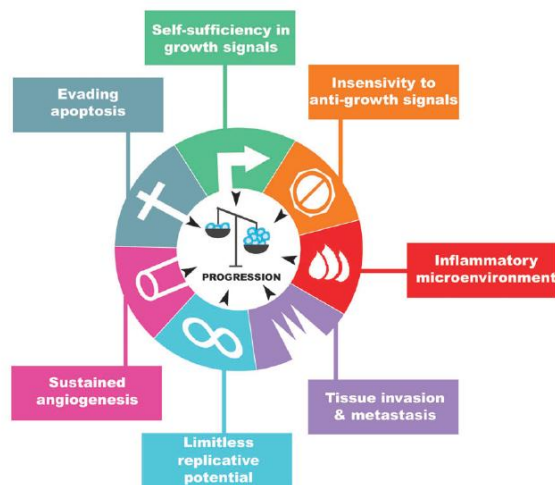
1. Inleiding

1.1. Kanker

Kanker vormt, na hart- en vaataandoening, de 2^{de} meest voorkomende doodsoorzaak in België met 26,94% van alle overlijdens (Belgian Federal Government, 2012). Bij één op drie mannen en één op vier vrouwen wordt voor de leeftijd van 75 jaar de diagnose van kanker gesteld. Aangezien 65% van de vrouwen en 76% van de mannen ouder dan 60 jaar zijn op het moment van de diagnose, kan gesteld worden dat kanker voornamelijk een ouderdomsziekte is (Belgian Cancer Registry, 2011a).

1.1.1. Eigenschappen van kanker

Kankercellen ontstaan wanneer cellen dergelijke veranderingen ondergaan waardoor hun aantal op een ongecontroleerde manier toeneemt, zonder de beperkingen van normaal weefsel zoals verankering aan het weefsel en invloeden van populatiedensiteit (Vanderkerken et al., 2011). Om te leiden tot deze onverstoorde celgroei moet een cel enkele eigenschappen verwerven (Figuur 1).



Figuur 1: Eigenschappen van kanker.

Voordat cellen ontaarden in kankercellen moeten ze enkele eigenschappen verwerven namelijk (1) het in stand houden van proliferatie, (2) het ontwijken van groei-inhibitoren, (3) invasie en metastase, (4) in staat zijn om oneindig te repliceren, (5) angiogenese induceren, (6) celdood voorkomen en (7) een inflammatoire tumoromgeving (Colotta et al., 2009).

Een eerste kenmerk is het in stand houden van proliferatie door middel van zelfvoorziening in groeifactoren. Deze groeifactoren binden aan en activeren receptoren waardoor de celcyclus en de celgroei beïnvloed worden. In normaal weefsel is er een goede balans tussen groeifactoren en receptoren en de activatie ervan. Bovendien is er een negatieve feedbackloop die actief wordt bij een teveel aan groeifactoren of bij een overmatige signaaltransductie. In tumorcellen is deze negatieve feedbackloop vaak verstoord. Tumoren kunnen ook zelf groeifactoren gaan produceren en via autocrine signaaltransductie hun eigen proliferatie in stand houden. Daarnaast kunnen tumorcellen signalen uitzenden naar cellen die in het stroma aanwezig zijn waardoor deze groeifactoren gaan afgeven die de tumor gaat gebruiken. Wanneer een tumor een verhoogd aantal receptoren op zijn membraan heeft kan er ook een verhoogde proliferatie optreden. Bovendien kunnen er in de receptoren mutaties aanwezig zijn die resulteren in een ligand-onafhankelijke signaaltransductie. Tenslotte kan een constitutieve activatie van onderliggende signaalwegen ook leiden tot een ligand-onafhankelijke signalisatie (Hanahan en Weinberg, 2011).

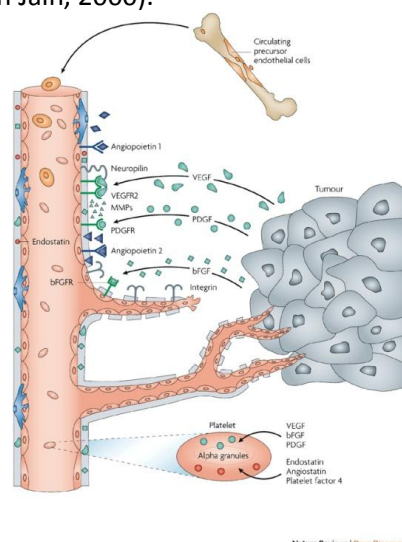
Een tweede eigenschap van kankercellen is de mogelijkheid om groei-inhibitoren te ontwijken. Tumorsuppressorgenen zijn genen die een negatieve invloed hebben op de celgroei en dus fungeren als groei-inhibitoren. De meest gekende zijn het retinoblastoma (*Rb*) gen en het *p53* gen. Het *Rb* gen ontvangt voornamelijk signalen uit het extracellulair milieu, terwijl het *p53* gen vooral beïnvloed wordt door signalen van intracellulaire processen. Als respons op de signalen beslissen deze eiwitten of de cel verder mag gaan in de celcyclus of er apoptotische programma's moeten geactiveerd worden (Hanahan en Weinberg, 2011). In tumoren zijn deze tumorsuppressorgenen vaak gemuteerd

waardoor ze niet werkzaam meer zijn. Bovendien treedt er in normaal weefsel contactinhibitie op. Dit zorgt voor een normale weefselhomeostase. Bij tumorcellen is deze contactinhibitie vaak verstoord of afwezig.

Apoptose of geprogrammeerde celdood treedt op bij genomische schade, hypoxie en metabole stoornissen en wordt vaak omzeild door tumorcellen waardoor cellen met DNA schade zich kunnen opstapelen (Hanahan en Weinberg, 2011; Pauwels et al., 2011). Door een mutatie in *p53*, verhoogde expressie van anti-apoptotische regulatoren zoals Bcl-2, overexpressie van overlevingssignalen zoals insuline-like-groefactor, onderdrukking van de pro-apoptotische factoren of modificatie van de extrinsieke apoptose signaalweg kan de apoptose verstoord zijn (Hanahan en Weinberg, 2011).

Als vierde kenmerk bezitten tumorcellen de eigenschap om oneindig te blijven repliceren. Normale cellen kunnen slechts een beperkt aantal succesvolle delingen ondergaan door het optreden van senescentie of celdood (Hanahan en Weinberg, 2011). Deze oneindige replicatie wordt bekomen door de aanwezigheid van telomerase. Telomerase is een enzym dat telomeersegmenten toevoegt aan de telomeren waardoor de telomeren niet verkorten tijdens de celdeling (Hanahan en Weinberg, 2011). Telomeren zijn tandem repeats die opgebouwd zijn uit een TTAGGG DNA sequentie. Ze bevinden zich aan het einde van een chromosoom en zorgen ervoor dat chromosomen niet met elkaar geen fuseren. Bovendien bevatten telomeren ook DNA-herstelenzymen en kunnen ze genen die zich vlakbij de telomeer bevinden gaan onderdrukken. Bij elke celdeling wordt het chromosoom korter door onvolledige replicatie. Deze verkorting treedt echter enkel op in de telomeren. Wanneer de telomeren volledig verkort zijn, sterft de cel af (McCaul et al., 2002). In normale cellen komt telomerase bijna niet voor waardoor de lengte van de telomeren en daarmee de bescherming van de uiteinden van het DNA afneemt bij elke replicatie waardoor celdood sneller kan optreden.

Door de continue proliferatie die tumorcellen ondergaan, is de aanvoer van nutriënten en zuurstof via de bestaande vasculatuur vaak onvoldoende voor de tumorcellen. Daarom moeten ze angiogenese kunnen induceren waardoor een tumor-geassocieerde neovasculatuur gevormd wordt (Hanahan en Weinberg, 2011). Deze inductie gebeurt door een onevenwicht van angiogenese-bevorderende en -inhiberende factoren, welke een angiogene switch wordt genoemd (Carmeliet, 2005). Deze angiogene switch ontstaat door de uitscheiding van vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF), matrix metalloproteïnase (MMP) en angiopoïetine 2 door de tumor (Folkman, 2007) (Figuur 2). In vergelijking met de normale vasculatuur is de tumorvasculatuur zeer abnormaal. De vaten zijn vaak vertakt, gedilateerd, bezitten endotheliale fenestrae en ontbreken vaak een basaal membraan wat de vaten zeer lek maakt. Door deze abnormale structuur is de bloedvoorziening in de tumor niet optimaal wat tot hypoxische regio's kan leiden die verschillend reageren op therapie dan de normoxische regio's (Carmeliet en Jain, 2000).



Figuur 2: Angiogenese bij kanker.

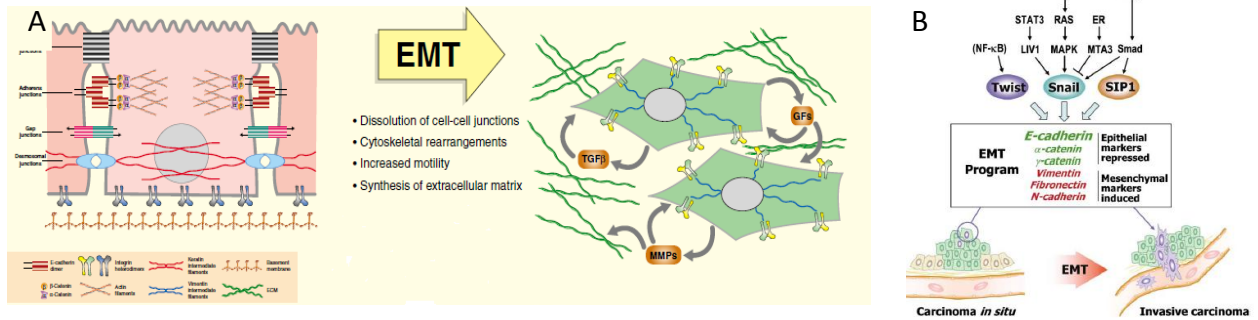
Door de uitscheiding van pro-angiogene factoren, zoals VEGF, MMP en angiopoïetine 2, door de tumor gaat de angiogenese geïnduceerd worden en ontstaat er een tumor neovasculatuur (Folkman, 2007).

De mogelijkheid tot onbeperkte invasie en metastasering is ook een kenmerk van tumorcellen. Bij invasie wordt het omgevend gezond weefsel vervangen door tumorweefsel waardoor metastasen (secundaire tumoren in omliggende lymfeklieren of in organen op afstand) kunnen ontstaan (Bracke et al., 2011). Kankerpijn wordt frequent veroorzaakt door metastasen. Door de beperkte kennis over hun moleculaire mechanismen en regulatie zijn er weinig doelgerichte therapieën beschikbaar tegen metastasen waardoor ze de meest frequente oorzaak zijn van kankergerelateerde overlijdens (Bracke et al., 2011; Mandic et al., 2004). Bij het vaststellen van metastasen daalt de overlevingskans van de patiënt aanzienlijk.

Een laatste kenmerk is de inflammatoire tumoromgeving die enerzijds kan resulteren in tumorprogressie, maar anderzijds ook de tumorprogressie kan onderdrukken (Colotta et al., 2009). Tumorprogressie door inflammatie kan optreden via twee signaalwegen. Bij de intrinsieke signaalweg zorgen verschillende oncogenen voor de ontwikkeling van inflammatoire reacties. De extrinsieke signaalweg zorgen inflammatoire condities voor de ontwikkeling van kanker. Zo zorgt chronische inflammatie door virale infecties voor baarmoeder- en leverkanker en kunnen autoimmuunziekten resulteren in darmkanker (Colotta et al., 2009). Dankzij de werking van transcriptiefactoren, cytokines, chemokines en infiltrerende leukocyten kan inflammatie tumorprogressie bevorderen. Dit gebeurt door een verminderde werking van de DNA herstelmechanismen en de celcyclus controlepunten waardoor genetische wijzigingen kunnen opstapelen (Colotta et al., 2009).

1.1.2. Epitheliale-mesenchymale transitie (EMT)

Epitheelcellen worden gekenmerkt door de aanwezigheid van cel-celcontacten zoals tight junctions, cadherine gebaseerde adherens juncties die verbonden zijn met actinevezels van het cytoskelet, gap junctions die instaan voor chemische interacties en desmosomen die verbonden zijn met intermediaire filamenten van het cytoskelet en de extracellulaire matrix (ECM). Daarnaast bezit epitheel ook een polariteit wat resulteert in verschillende functies voor het apicaal en basolateraal oppervlak (Radisky, 2005). Door de aanwezigheid van cel-celcontacten kunnen de epitheelcellen het omringend weefsel niet invaderen. Daarvoor moeten de epitheelcellen de kenmerken van mesenchymale cellen verwerven, wat zich vertaalt in het verlies van de cel-celcontacten, het verwerven van andere cel-ECM contacten en andere cytoskeletelementen. Daarnaast moeten de cellen ook MMP en signaaleiwitten produceren, zodat ze een invloed hebben op de ECM en de epitheelcellen (Radisky, 2005). Deze verwerving van mesenchymale kenmerken door epitheelcellen wordt epitheliale-mesenchymale transitie (EMT) genoemd. EMT kan onderverdeeld worden in drie types op basis van de biologische kenmerken. Type 3 EMT is het type dat voorkomt bij epitheliale kankercellen en zal, door het optreden van cytoskeletwijzigingen en de ontwikkeling van een nieuw transcriptioneel programma, resulteren in migratoire eigenschappen en een mesenchymaal fenotype voor de epitheelcellen (Figuur 3) (Kalluri, 2009). Bij EMT worden cel-cel en cel-ECM contacten gewijzigd, waardoor epitheelcellen kunnen loskomen van het omringend weefsel. Voornamelijk E-cadherine, wat een belangrijke component is van cel-cel connecties, gaat verloren door inactiverende mutaties van het gen of door binding van *Snail*, *Twist* of *SIP-1* aan de promotor van E-cadherine (Figuur 3) (Kang en Massague, 2004). Een karakteristiek expressiepatroon van cellen die EMT kunnen ondergaan is een lage concentratie E-cadherine en een hoge concentratie vimentine, wat een cytoskeletelement is (Brand et al., 2011; Smith et al., 2013). Naast de vorming van metastasen kan EMT ook zorgen voor een verhoogde tumorprogressie aangezien *Snail*, één van de genen betrokken bij EMT, cellen beschermt tegen apoptose (Barrallo-Gimeno en Nieto, 2005).



Figuur 3: EMT.

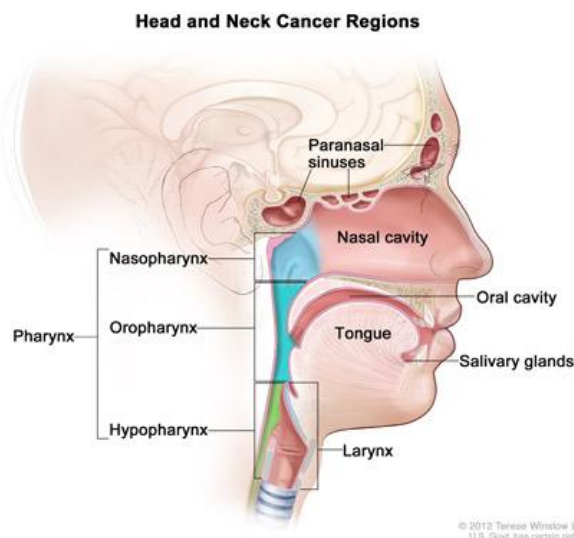
A: Tijdens epitheliale-mesenchymale transitie (EMT) gaan epitheelkenmerken zoals de expressie van E-cadherine, celpolarisatie en cel-cel en cel-matrix connecties verloren. De cellen verkrijgen eigenschappen die typisch zijn voor mesenchymale cellen zoals andere cel-cel connecties, andere cytoskeletelementen en de productie van matrix metalloproteïnasen en signaaleiwitten (Radisky, 2005).

B: *Twist*, *Snail* en *SIP-1* gaan binden aan de promotor van E-cadherine waardoor E-cadherine minder tot expressie komt. Mesenchymale eigenschappen, zoals de expressie van vimentine, worden verhoogd. Door het optreden van EMT kan een invasief carcinoom ontstaan (Kang en Massague, 2004).

1.2. Hoofdhalskanker

Hoofdhalskanker is met 6% van alle kankergevallen de 4^{de} meest voorkomende kankervorm bij mannen. Bij vrouwen is het de 9^{de} meest voorkomende kankervorm met 2,1% van alle gediagnosticeerde tumoren. Naast de hoge incidentie heeft hoofdhalskanker ook een hoge mortaliteit. Bij mannen zijn hoofdhalstumoren verantwoordelijk voor 3,8% van alle kankergerelateerde overlijdens terwijl deze bij vrouwen 1,4% van alle kankergerelateerde overlijdens veroorzaken. In België wordt de hoogste incidentie waargenomen in Wallonië (Belgian Cancer Registry, 2011b). Dit kan verklaard worden doordat Wallonië het hoogste aantal dagelijkse rokers telt (Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid, 2008).

Hoofdhalskankers zijn tumoren die ontstaan uit de mondholte, de neusholte, de farynx, de larynx, de speekselklieren en de paranasale sinussen (National Cancer Institute, 2012; Vlaamse Liga tegen Kanker, 2011) (Figuur 4). Squameuze hoofdhalscarinomas (HNSCC) ontstaan uit de epitheel laag van deze regio's. Van alle hoofdhalscarinomas zijn meer dan 90% HNSCC (Argiris et al., 2008; Walden en Aygun, 2013).



Figuur 4: Voornaamste plaatsen voor de ontwikkeling van HNSCC.

Meer dan 90% van de hoofdhalscarinomas zijn HNSCC welke ontstaan uit de epitheel laag van de mondholte, de neusholte, de farynx, de larynx, de speekselklieren en de paranasale sinussen (National Cancer Institute, 2012).

Afhankelijk van de regio waar de kanker ontstaan is, kan de vijfjaarsoverleving variëren van 30% in de hypofarynx, 50% in de orofarynx en tonsillen en tot 60% in de mondholte (Walden en Aygun, 2013). HNSCC worden gekenmerkt door een vroege metastasering naar de lymfevaten, wat de vijfjaarsoverleving negatief beïnvloedt (Mandic et al., 2004). Zo daalt de vijfjaarsoverleving bij tongkanker van 50% naar 30% bij het optreden van metastasen (Werner et al., 2003).

1.2.1. Risicofactoren

Hoewel de incidentie van HNSCC leeftijdsgebonden is, zijn er enkele risicofactoren gekend. Alcoholconsumptie en roken zijn in 75% van de HNSCC betrokken bij de tumorvorming waardoor ze de voornaamste risicofactoren voor de ontwikkeling van HNSCC zijn (Argiris et al., 2008). Ook het kauwen van tabak of betelnoten verhoogt het risico op kanker van de mondholte (Walden en Aygun, 2013). Voeding kan ook een invloed hebben op de ontwikkeling van HNSCC. Zo zorgt een dagelijkse inname van fruit en groenten voor een verlaging van de kans op de ontwikkeling van HNSCC (Pavia et al., 2006; Walden en Aygun, 2013). Tenslotte kunnen oncogene virussen aan de basis liggen van de vorming van HNSCC. Ongeveer 25% van de HNSCC blijken positief te zijn voor het humaan papillomavirus (HPV) (Argiris et al., 2008). Dergelijke tumoren worden vooral bij jongere patiënten gediagnosticeerd en hebben met een vijfjaarsoverleving van 70% tot 80% een betere overleving en respons op therapie dan HPV-negatieve HNSCC (O'Rorke et al., 2012). Daar waar de incidentie van HPV-negatieve HNSCC wereldwijd afneemt, lijkt de incidentie van HPV-gerelateerde HNSCC eerder toe te nemen (Joseph en D'Souza, 2012). Bij een infectie met HPV, die voornamelijk de basale epitheellaag aantast, wordt HPV-DNA in het genoom van de gastheer geplaatst, wat resulteert in een onderbreking van E2, de voornaamste virale transcriptiefactor. E2 is een repressor van de oncogenen E6 en E7 waardoor een insertie van het HPV-DNA een verhoogde expressie van E6 en E7 oplevert. E6 en E7 produceren eiwitten die kunnen binden aan p53 en het retinoblastoma (Rb) eiwit, waardoor deze eiwitten geïnactiveerd worden (Chang en Califano, 2008; Psyrrri et al., 2009). Dit resulteert in een verminderde apoptose, een verhoogde cellulaire immortalisatie en schade aan het DNA herstelmechanisme en de regulatoren van de celcyclus. Bij blootstelling aan genotoxische producten gaat de expressie van E6 en E7 afnemen, waardoor de p53 signaalweg opnieuw actief wordt en apoptose geïnduceerd wordt (O'Rorke et al., 2012). Infectie met HPV kan veroorzaakt worden door seksuele overdracht van het virus (Walden en Aygun, 2013). Bovendien hebben patiënten met een onderdrukt immuunsysteem zoals HIV-patiënten en posttransplantatiepatiënten een verhoogd risico op de ontwikkeling van HPV-positieve HNSCC (Psyrrri et al., 2009). Vaccinatie tegen HPV kan de ontwikkeling van HPV-positieve HNSCC mogelijk voorkomen (Argiris et al., 2008). Naast HPV kan ook een infectie met het Epstein-Barr virus leiden tot de ontwikkeling van HNSCC (Walden en Aygun, 2013). LMP1, het genproduct van het Epstein-Barr virus, zorgt voor een verhoogde EGFR-expressie (Grandis en Sok, 2004).

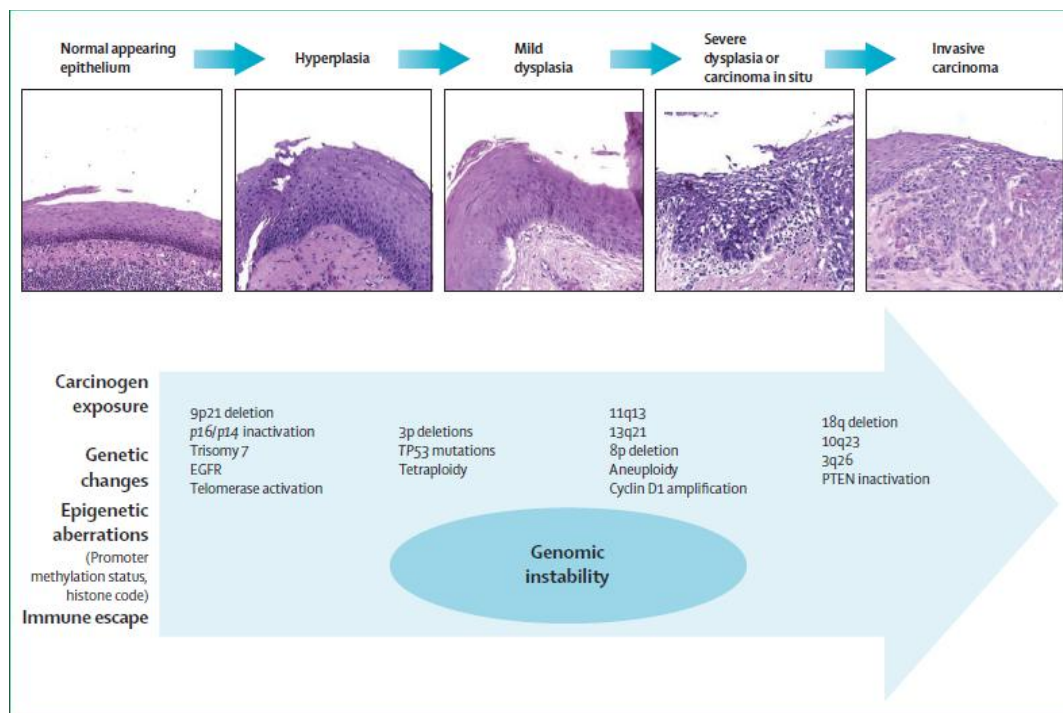
1.2.2. Huidige therapie

Bij diagnose vertonen 40% van de patiënten een tumor in stadium I of stadium II (Vermorken en Specenier, 2010). De overige 60% van de patiënten vertonen tumoren in een gevorderd stadium met metastasen naar de regionale lymfeknopen (Argiris et al., 2008; Vermorken en Specenier, 2010; Walden en Aygun, 2013). Bij 10% van de patiënten wordt bij diagnose metastasen op afstand vastgesteld (Argiris et al., 2008). Het stadium van de tumor bepaalt mee de aangewezen therapie voor HNSCC, naast de primaire locatie van de tumor, de voorkeur en de algemene toestand van de patiënt (Licitra en Felip, 2009; Vermorken en Specenier, 2010; Werner et al., 2002). Tumoren in stadium I of II worden behandeld met chirurgie of radiotherapie (Vermorken en Specenier, 2010). Het nadeel van chirurgie is dat er vaak neveneffecten optreden die de primaire fysiologische functies zoals ademen, spreken en slikken kunnen beïnvloeden. Bovendien kunnen er ook cosmetische neveneffecten optreden (Werner et al., 2002). Uitgebreide tumoren (stadium III en IV) worden behandeld met chirurgie gecombineerd met postoperatieve radiotherapie (Vermorken en Specenier, 2010). Wanneer tijdens de operatie blijkt dat de patiënt een groot risico loopt op metastasen door de aanwezigheid van extracapsulaire uitbreidingen, wordt er postoperatieve chemoradiotherapie met

platinum toegepast (Argiris et al., 2008; Vermorken en Specenier, 2010). Indien blijkt dat de tumor niet verwijderd kan worden door een invasie van de carotiden, schedelbasis of prevertebrale musculatuur, wordt cisplatine-gebaseerde chemoradiotherapie toegepast. De kans op overleving wordt bepaald door de omvang van de tumor. Stadium I tumoren hebben een kans op genezing van 90% terwijl de genezing bij stadium II tumoren ongeveer 70% bedraagt (Argiris et al., 2008). In 20% tot 30% van de patiënten ontstaat, ondanks de verschillende behandelingschema's, metastasering of herval (Vermorken en Specenier, 2010). In dergelijke gevallen wordt chirurgie of radiotherapie toegepast indien dit mogelijk is. Anders wordt een palliatieve chemotherapie met een wekelijkse toediening van methotrexaat als standaardbehandeling gebruikt (Licitra en Felip, 2009).

1.2.3. Pathogenese

HNSCC ontstaan uit een premaligne voorlopercel die een kolonie gaat vormen waarin genetische en epigenetische wijzigingen optreden (Figuur 5) (Perez-Ordóñez et al., 2006). Door deze wijzigingen ontstaat er genomische instabiliteit wat resulteert in een hogere mutatiesnelheid. Hierdoor zijn de cellen in staat om te overleven onder minder gunstige omstandigheden zoals hypoxie (Vanderkerken et al., 2011).



Figuur 5: De ontwikkeling van maligne HNSCC.

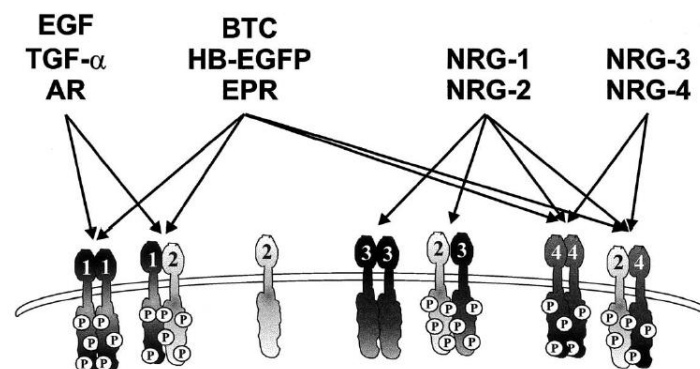
Tijdens de ontwikkeling van een maligne HNSCC treden er verschillende genetische en epigenetische wijzigingen op. Deze wijzigingen leiden tot genomische instabiliteit (Argiris et al., 2008).

De ontwikkeling van hyperplasie wordt gekenmerkt door wijzigingen die resulteren in een abnormaal verhoogde celdeling, zoals het verlies van heterozygositeit van 9p21, wat in 70% tot 80% van de HNSCC optreedt (Argiris et al., 2008; Perez-Ordóñez et al., 2006). Op chromosoom 9p21 ligt het *CDKN2A* gen wat codeert voor p16 (cycline-afhankelijke kinase inhibitor, CDKI) en p14. Deze transcripten staan in voor de regulatie van de celcyclus en de degradatie van p53 (Perez-Ordóñez et al., 2006). Tevens kan door hypermethylering van de promotor p16 en p14 geïnactiveerd worden, wat resulteert in een verhoogde fosforylering van Rb (Perez-Ordóñez et al., 2006; Rocco en Sidransky, 2001). Daarnaast wordt in 90% van de HNSCC een verhoogde telomeraseactiviteit waargenomen bij de ontwikkeling van een hyperplasie. Door deze verhoogde activiteit treedt er immortalisatie van de cel op, waardoor opgestapelde genetische wijzigingen behouden blijven (Argiris et al., 2008). De expressie van de epidermale groeifactor receptor (EGFR) is in meer dan 90% van de HNSCC verhoogd bij de ontwikkeling van een hyperplasie (Argiris et al., 2008; Kalyankrishna en Grandis, 2006). Het

volgende stadium, milde dysplasie, wordt gekenmerkt door inactivering of verlies van tumorsuppressorgen. Door het verlies van chromosoom 3p is er een verlies van *FHIT*, een tumorsuppressorgen gelegen op locus 3p14. Op locus 3p21 ligt het tumorsuppressorgen *RSSF1A* (Perez-Ordóñez et al., 2006). Mutaties in p53 of verlies van heterozygositeit van chromosoom 17, wat leidt tot verlies van p53, komt voor in 50% van de HNSCC (Argiris et al., 2008; Perez-Ordóñez et al., 2006). Dergelijke mutaties in p53 zijn vaak het gevolg van roken, aangezien in HNSCC 64% van de mutaties in p53 voorkomen in G-nucleotiden, wat karakteristiek veroorzaakt wordt door carcinogenen zoals tabak (Perez-Ordóñez et al., 2006). Bij de overgang van een milde dysplasie naar een *carcinoma in situ* treedt er in 30% tot 60% van de HNSCC een amplificatie van 11q13 op, waardoor er een amplificatie ontstaat van cycline D1 (Argiris et al., 2008). Overexpressie van cycline D1 resulteert in een verhoogde fosforylatie van Rb waardoor er een progressie is van de celcyclus van de G₁ fase naar de S fase. Door de amplificatie van 11q13 kunnen de cellen makkelijker metastaseren naar omliggende lymfeknopen en bijgevolg kan een *carcinoma in situ* snel overgaan naar een invasief carcinoom (Perez-Ordóñez et al., 2006).

1.3. Epidermale groeifactor receptor (EGFR)

EGFR is een receptor tyrosine kinase (RTK) die behoort tot de ErbB of EGF receptor familie. Deze familie omvat naast EGFR/ErbB1/HER1 nog drie andere leden, namelijk ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 en ErbB4/HER4. Al deze receptoren zijn opgebouwd uit een extracellulair ligand bindend domein, een transmembranair domein en een C-terminaal cytoplasmatisch deel dat opgebouwd is uit een kinasedomein en meerdere fosforylatieplaatsen die tyrosine residu's bevatten (Kalyankrishna en Grandis, 2006). Het verschil tussen de receptoren bevindt zich in de opbouw van het extracellulair ligand bindend domein en het C-terminaal cytoplasmatisch deel (Grandis en Sok, 2004). Door de specificiteit van de verschillende liganden, kunnen de liganden in drie verschillende groepen verdeeld worden (Figuur 6). De eerste groep omvat EGF, amfireguline (AR) en transformerende groeifactor α (TGF- α) welke liganden zijn die specifiek binden aan EGFR. Betacelluline (BTC), heparine-bindende EGF (HB-EGF) en epireguline (EPR) behoren tot een tweede groep en binden specifiek aan EGFR en ErbB4. De derde groep omvat neuregulines (NRG) die onderverdeeld worden in subgroepen afhankelijk van hun specificiteit voor ErbB3 en ErbB4, zoals NRG-1 en NRG-2, of ErbB4 alleen, zoals NRG-3 en NRG-4 (Holbro et al., 2003).

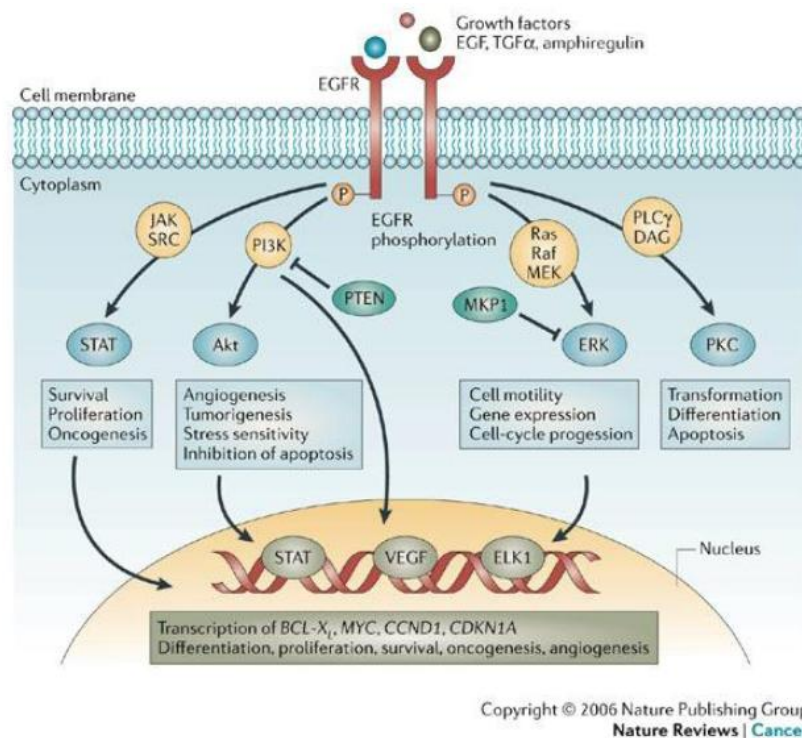


Figuur 6: De specificiteit van de verschillende liganden voor EGF tyrosine kinase receptoren.

Afhankelijk van hun bindingsspecificiteit worden liganden in drie groepen onderverdeeld. Door binding van de ligand aan het extracellulair ligand bindend domein treedt er dimerisatie van de receptor op. Aangezien ErbB2 geen eigen ligand heeft, moet het heterodimerisatie ondergaan om geactiveerd te worden (Holbro et al., 2003).

Door de binding van een ligand aan het extracellulair ligand bindend domein treedt er een conformationele verandering op in de receptor, waardoor deze gaat dimeriseren met eenzelfde receptor (homodimerisatie) of met een andere receptor uit de EGF receptor familie (heterodimerisatie). Aangezien er geen directe liganden voor ErbB2 bestaan, moet ErbB2 heterodimerisatie ondergaan om geactiveerd te worden (Figuur 6) (Cantley, 2009; Holbro et al., 2003). Dimerisatie resulteert in activatie van de intracellulaire kinasedomeinen, waardoor

autofosforylatie optreedt van de tyrosine residu's in het C-terminaal domein. Aan deze gefosforyleerde tyrosines binden signaalmoleculen die een Src-homologie 2 of 3 (SH2 of SH3) domein bevatten, en worden intracellulaire signaalwegen geactiveerd (Bishayee, 2000; Cantley, 2009; Holbro et al., 2003). Het kinedomein van ErbB3 is minder actief, maar door binding van ATP aan het intracellulair domein kan er fosforylatie optreden (Bishayee, 2000). De belangrijkste signaalwegen die door EGFR geactiveerd worden zijn de MAPK, PI3K/AKT, STAT en PLC γ /PKC signaalwegen (Figuur 7) (Kalyankrishna en Grandis, 2006). Activatie van de MAPK signaalweg resulteert in een transactivatie of transrepressie van c-Myc, c-Jun, c-Fos en Elk-1. Hierdoor komt cycline D1 verhoogd tot expressie en wordt in de celcyclus het G1 controlepunt gepasseerd, gevolgd door mitose en DNA synthese (Igarashi, 2009; Rogers et al., 2005). STAT zal, wanneer het geactiveerd wordt door fosforylatie aan EGFR, een translocatie naar de nucleus ondergaan. Hier oefent het een effect uit op cycline D1 en Bcl-xL, waardoor de celproliferatie geactiveerd en apoptose geïnhibeerd wordt (Igarashi, 2009; Rogers et al., 2005). De PI3K signaalweg heeft een inhiberend effect op de apoptose door de activatie van AKT. Dit resulteert in de onderdrukking van pro-apoptotische eiwitten, zoals Bad en caspase 9, en de activatie van overlevingsfactoren, zoals nucleaire factor- κ B (NF- κ B). Daarnaast heeft AKT ook een stimulerend effect op cycline D1 (Rogers et al., 2005). Na activatie van PKC door PLC γ worden actinmodifierende eiwitten gemobiliseerd en wordt de cel migratoir (Rogers et al., 2005). In normale cellen wordt de EGFR signaalweg gecontroleerd en enkel geactiveerd bij wondheling, epitheelontwikkeling of andere fysiologische processen (Rogers et al., 2005).



Figuur 7: De belangrijkste onderliggende signaalwegen van EGFR.

Binding van een ligand aan de receptor zorgt voor fosforylatie en activatie van de receptor, waardoor verschillende onderliggende signaalwegen geactiveerd worden. Dit resulteert in anti-apoptose, differentiatie, transformatie, migratie en proliferatie (Nyati et al., 2006).

Naast binding met een ligand kan EGFR geactiveerd worden door transactivatie via G-proteïne gekoppelde receptoren (GPCR). Transactivatie kan gebeuren via twee mechanismen. Een eerste mechanisme is fosforylatie van het intracellulair domein van de receptor door andere kinasen. Daarnaast kan autofosforylatie optreden door binding van een ligand, geactiveerd door GPCR, aan de receptor. Deze ligand wordt tijdens ectodomein *shedding* door *A disintegrin and metalloproteinase* (ADAM) omgezet van een inactieve, membraangebonden proligand naar een actieve, oplosbare ligand. Ectodomein *shedding* wordt veroorzaakt door groeifactoren en cytokines die GPCR en

bijgevolg ADAM gaan activeren (Higashiyama et al., 2008; Holbro et al., 2003). Tenslotte kunnen liganden van GPCR signaalwegen activeren die zorgen voor fosforylatie van het intracellulaire domein van EGFR (Grandis en Sok, 2004). Ook celadhesiemoleculen en andere RTK kunnen EGFR activeren (Rogers et al., 2005).

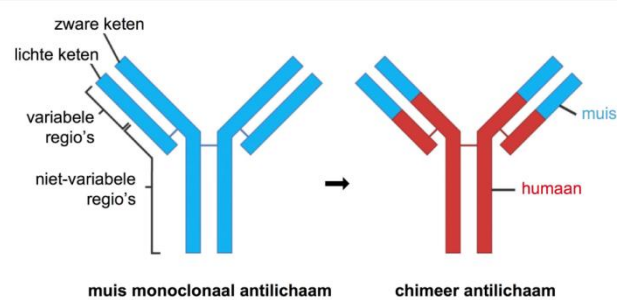
Geactiveerde EGFR worden geïnternaliseerd en naar vroege endosomen gebracht (Burke et al., 2001). Van hieruit kunnen de receptoren verschillende processen ondergaan. Ten eerste kunnen de receptoren gerecycleerd worden via een recyclerende signaalweg of recyclerende endosomen die de receptor terug naar de celmembraan brengt. Het tweede proces dat de receptoren kunnen ondergaan is transport naar late endosomen. Hier ondergaan de receptoren lysosomale degradatie. Tenslotte kunnen de receptoren vanuit de endosomen getransporteerd worden naar verschillende celcompartimenten zoals het Golgi-apparaat, het endoplasmatisch reticulum, de mitochondria of de nucleus (Wang en Hung, 2012). Naast deze internalisatie kan EGFR interageren met importine β_1 via het nucleair lokalisatie signaal (Lo et al., 2006). EGFR oefent in de nucleus een effect uit op cycline D1, B-Myb, iNOS, Aurora-A, COX-2, c-Myc, thymidylaat synthase en BCRP, waardoor de tumorvorming, chromosoominstabiliteit en chemoresistentie beïnvloed wordt (Wang en Hung, 2012).

Verhoogde EGFR expressie wordt niet alleen in HNSCC geobserveerd. Ook in darm-, long-, borst-, prostaat-, blaas-, eierstok- en baarmoederkanker wordt een verhoogde expressie waargenomen (Grandis en Sok, 2004). Er bestaan verschillende mechanismen die verantwoordelijk zijn voor een verstoorde EGFR expressie. De meest voorkomende oorzaak van een verstoorde EGFR expressie is door het optreden van epigenetische wijzigingen. Een tweede mechanisme is overproductie van de liganden, waardoor de receptor meer geactiveerd wordt. Daarnaast kunnen oncogene virussen, zoals het hepatitis B virus, de promotor van *EGFR* activeren wat resulteert in een verhoogde EGFR expressie. Tenslotte kunnen genetische wijzigingen ook aan de basis liggen van een pathologische functie van EGFR. De deletie van exon 2 tot 7 van het extracellulair ligand bindend domein van EGFR resulteert in de vorming van EGFR variant III (EGFRvIII), een constitutief actieve variant van EGFR (Kalyankrishna en Grandis, 2006; Rogers et al., 2005). Polymorfismen in het EGFR gen of de promotor van EGFR, zoals deze ter hoogte van de bindingssite voor de SP1 transcriptiefactor en ter hoogte van de transcriptie initiatie site, kunnen resulteren in een verhoogde expressie van EGFR (Ratushny et al., 2009). Tenslotte kunnen ook mutaties in het kinasedomein van EGFR bijdragen tot een verstoorde functie van EGFR. Dergelijke mutaties omvatten vaak aminozuur substituties rond de ATP-bindingsplaats in het kinasedomein waardoor ATP makkelijker bindt aan deze bindingsplaats en er meer ligand-afhankelijke activatie optreedt (Ratushny et al., 2009).

1.4. Doelgerichte therapie

Aangezien in meer dan 90% van de HNSCC en in andere kankersoorten een verhoogde expressie van EGFR aanwezig is, werden er twee soorten anti-EGFR therapeutica ontwikkeld. De eerste groep omvat monoklonale antilichamen die gericht zijn tegen het extracellulair domein van EGFR, zoals cetuximab en panitumumab, die vaak een anti-proliferatief, radiosensitizerend en synergistisch effect met chemotherapeutica vertonen (Bonner et al., 2006; Huang et al., 1999; Langer, 2008; Milas et al., 2000). Een tweede groep omvat tyrosine kinase inhibitoren, zoals gefitinib en erlotinib, welke aan het intracellulair tyrosine kinasedomein binden (Langer, 2008). Deze inhibitoren vertonen echter een minder radiosensitizerend en synergistisch effect dan de eerste groep. Dit kan verklaard worden door een ander effect op kankerstemcellen, een ander effect op de nutriëntvoorziening van de tumorcellen, het ontbreken van immunogene effecten die bij antilichamen wel optreden en een verschillende farmacokinetiek (Astsaturov et al., 2006). Cetuximab (Erbix[®]), een monoklonaal chimeer immunoglobuline G1 (IgG1) antilichaam, is het enige anti-EGFR therapeutikum dat is goedgekeurd voor toediening bij HNSCC (European Medicines Agency, 2013; Specenier et al., 2011; Vermorken en Specenier, 2010). Aangezien cetuximab oorspronkelijk een muisantilichaam was en bij toediening aan patiënten een zware immuunrespons zou opwekken, werd een chimere of gehumaniseerde variant ontwikkeld. Hierbij werd het humaan Fc-gedeelte van het antilichaam gekoppeld aan het variabele antigenbindende domein van het muisantilichaam (Figuur 8) (Specenier

et al., 2011). Cetuximab bezit een hogere affiniteit voor EGFR dan de liganden EGF en TGF- α waardoor het antilichaam makkelijker kan binden aan de receptor (Langer, 2008). Door de binding van cetuximab aan het extracellulair ligand bindend domein treedt er, naast een verstoorde ligand-receptorbinding, ook een sterische hindering op van het dimerisatiedomein van EGFR (Brand et al., 2011). Hierdoor wordt dimerisatie en activatie van de receptor voorkomen (Brand et al., 2011; Langer, 2008). Dit resulteert in een afname van angiogenese-bevorderende factoren en een inhibitie van de celproliferatie (Moon et al., 2010). Door de aanwezigheid van het humaan Fc-gedeelte kan een antilichaamsafhankelijke cytolyse optreden waarbij EGFR endocytose ondergaat (Specenier et al., 2011).



Figuur 8: Schematische weergave van een chimeer antilichaam.

Een chimeer of gehumaniseerd antilichaam wordt verkregen door een humaan Fc-gedeelte van een antilichaam te koppelen aan het variabele antigenbindende domein van het muisantilichaam. Hierdoor wordt een zware immunrespons bij toediening van het antilichaam voorkomen (Specenier et al., 2011).

Bij niet-gemetastaseerde HNSCC wordt cetuximab gecombineerd met radiotherapie, waardoor de ziekte gedurende gemiddeld 24,4 maanden stabiel blijft in plaats van 14,9 maanden (European Medicines Agency, 2013). In deze opzet wordt cetuximab vooral toegediend als radiosensitizerend product (Moon et al., 2010). Bij gemetastaseerde of recidiverende HNSCC wordt een combinatie van cetuximab en een platinum-gebaseerde chemotherapie toegepast wat zorgt voor een reductie van 20% van de relatieve kans op overlijden en een statistisch significante verlenging van de overleving met 2,7 maanden (10,1 maanden in plaats van 7,4 maanden) (European Medicines Agency, 2013; Vermorken et al., 2008). Aangezien cetuximab bij meer dan 80% van de patiënten huidreacties veroorzaakt, wordt de patiënt initieel behandeld met antihistaminica en corticosteroiden alvorens de wekelijkse behandeling met cetuximab te starten (European Medicines Agency, 2013; Moon et al., 2010). Wanneer er een combinatietherapie van radiotherapie en cetuximab toegepast wordt, wordt een week voor de start van de radiotherapie gestart met de toediening van cetuximab (European Medicines Agency, 2013). Naast de toepassing bij HNSCC wordt cetuximab ook gebruikt voor de behandeling van gemetastaseerde colon- en rectumcarcinomen (European Medicines Agency, 2013).

1.4.1. Resistentie tegen doelgerichte therapie

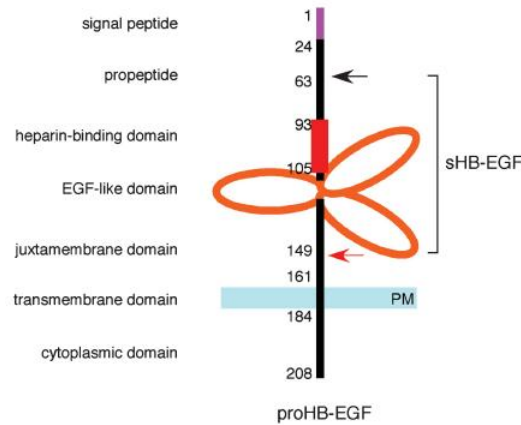
Ondanks de duidelijke relatie tussen EGFR en HNSCC zijn de klinische effecten van cetuximab vrij bescheiden met een verlengde overleving van 2,7 maanden en een reductie van 20% van de relatieve kans op overlijden (Vermorken et al., 2008). Dit duidt op de aanwezigheid van intrinsieke en verworven resistentie aan deze doelgerichte therapie (Ratushny et al., 2009). Intrinsieke, primaire of *denovoresistentie* treedt op wanneer tumoren bij diagnose al resistent zijn aan therapie (Lardon et al., 2011). Deze resistentie uit zich in het niet bereiken van een stabiele ziekte (Chen et al., 2010). Daarnaast kunnen tumorcellen na een langdurige behandeling resistentie ontwikkelen tegen de doelgerichte therapie. Deze vorm van resistentie wordt verworven of secundaire resistentie genoemd. Vaak treedt er ook kruisresistentie op waarbij de tumor resistent wordt aan verschillende therapeutica van dezelfde klasse (Lardon et al., 2011). Daarnaast kunnen EGFR-inhibitor resistente HNSCC ook een resistentie aan radiotherapie ontwikkelen (Benavente et al., 2009).

Voor de ontwikkeling van resistentie aan doelgerichte EGFR therapie in HNSCC werden reeds enkele mechanismen in de literatuur beschreven. Ten eerste kan verstoring plaatsvinden ter hoogte van

EGFR zelf. Dit kan ontstaan door expressie van EGFR familie liganden. Door een verhoogde expressie gaan deze liganden in competitie met cetuximab en bij een overmaat aan liganden kan cetuximab niet meer binden aan de receptor. Bovendien kan een verhoogde expressie van een ligand zorgen voor een verhoogde expressie van een andere ligand van EGFR. Dit proces wordt kruis-of auto-inductie genoemd (O-Charoenrat et al., 2000). Zo werd in resistente HNSCC een verhoogde expressie van HB-EGF, AREG, TGF- α , EGF en BTC waargenomen (Brand et al., 2011; O-Charoenrat et al., 2000). Bovendien stimuleren EGFR liganden de internalisatie van EGFR waardoor er meer nucleair EGFR gevormd wordt wat een effect gaat uitoefenen op verschillende celcyclusgenen (Li et al., 2009). Aangezien cetuximab niet kan binden aan deze nucleaire vorm van EGFR wordt resistentie zo in de hand gewerkt. Ook mutaties kunnen leiden tot afwijkende EGFR levels. Secundaire mutaties in het extracellulair domein van EGFR kunnen resulteren in een verminderde affiniteit van cetuximab voor de receptor en secundaire mutaties in de promotor van EGFR zorgen voor een verhoogde expressie van EGFR (Chen et al., 2010). Daarnaast zorgt de EGFRVIII, welke aanwezig is in 0% tot 42% van alle HNSCC, voor een constitutieve activatie van de EGFR signaalwegen ondanks EGFR doelgerichte therapie (Chen et al., 2010; Hama et al., 2009; Sok et al., 2006; Szabo et al., 2011; Wheeler et al., 2010). Een tweede mechanisme voor de ontwikkeling van resistentie tegen doelgerichte therapie bestaat uit constitutieve activatie van onderliggende signaalwegen. Zo zorgt verlies van de fosfatase en tensine homolog (PTEN) voor een constitutieve activatie van AKT (Chen et al., 2010). PTEN is een antagonist voor fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Morgillo et al., 2007). Activatie van PTEN zorgt voor een verminderde activiteit van PI3K, waardoor er minder fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfaat (PIP₃) geproduceerd wordt en er bijgevolg minder AKT gerekruteerd wordt. Dit resulteert in een pauze in de celcyclus door verminderde activatie van cycline D1. Omwille van deze antagonistische werking wordt PTEN aanzien als een tumorsuppressor (Ratushny et al., 2009). Ook *K-Ras* mutaties zorgen voor een constitutief geactiveerd signaalmolecule (Chen et al., 2010). Deze mutaties komen echter in minder dan 5% van de HNSCC voor (Hoa et al., 2002; Murugan et al., 2012; Paliga et al., 2012). Daarnaast komen *H-Ras* mutaties in 11,2% tot 22% van de Aziatische HNSCC-patiënten voor (Anderson et al., 1994; Chen et al., 2010; Murugan et al., 2012). Een derde mechanisme bestaat uit activatie van alternatieve signaalwegen, waardoor de blokkade van de EGFR-signalwegen omzeild kan worden. G-proteïne gekoppelde receptoren kunnen EGFR-onafhankelijke signaalwegen activeren na een blokkade van EGFR (Chen et al., 2010). Aangezien de insuline gerelateerde groeifactor receptor 1 (IGF-1R) dezelfde onderliggende signaalwegen als EGFR heeft, kan activatie van IGF-1R verantwoordelijk zijn voor de ontwikkeling van resistentie tegen EGFR doelgerichte therapie (Camp et al., 2005). Tenslotte zijn er nog enkele andere mechanismen die kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van resistentie tegen doelgerichte therapie. Inhibitie van angiogenese is één van de functies van cetuximab. Door activatie van alternatieve signaalwegen die onafhankelijk zijn van EGFR kunnen angiogenese-bevorderende factoren opnieuw geactiveerd worden. Dit resulteert in de ontwikkeling van verworven resistentie. Zo is er vaak een twee- tot drievoudige expressie van VEGF in resistente tumoren (Brand et al., 2011; Vilorio-Petit et al., 2001). Naast deze verhoogde expressie van VEGF wordt er in resistente HNSCC ook regelmatig een verhoogde expressie van mediators van VEGF, zoals cyclooxygenase-2 en MAPK, aangetoond (Camp et al., 2005). Aangezien uit onderzoek is gebleken dat mesenchymale cellen resistent zijn aan cetuximab, draagt EMT ook bij aan resistentie tegen cetuximab (Chen et al., 2010). Deze resistentie ontstaat door een verhoogde activiteit van AKT in de mesenchymale cellen, terwijl epitheelcellen door de aanwezigheid van E-cadherine, wat een EGFR-activerend eiwit is, gevoelig zijn voor de doelgerichte therapie (Brand et al., 2011; Kalyankrishna en Grandis, 2006). Daarnaast kan een verstoring van de internalisatie en degradatie van EGFR ook bijdragen tot de ontwikkeling van resistentie, aangezien er hierdoor een toegenomen activiteit van EGFR ontstaat (Brand et al., 2011; Wheeler et al., 2008). Deze verstoring wordt gezien na een langdurige behandeling met cetuximab (Wheeler et al., 2008). Tenslotte kan resistentie ook het gevolg zijn van patiënt-gerelateerde oorzaken, zoals een deficiënt immuunsysteem en een versneld metabolisme en verstoorde absorptie van EGFR (Morgillo et al., 2007).

1.5. Heparine-bindende epidermale groeifactor (HB-EGF)

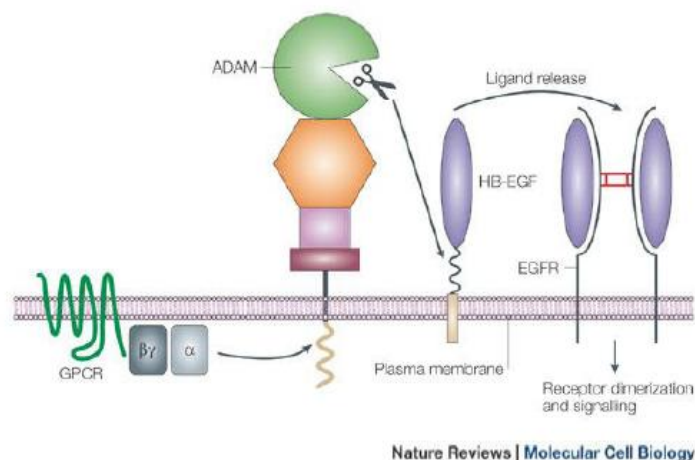
Initieel komt HB-EGF voor als een transmembranair pro-HB-EGF wat opgebouwd is uit 280 aminozuren. Dit eiwit bestaat uit een signaaleiwit, een pro-eiwit, een heparine-bindend domein, een EGF gerelateerd domein, een juxtamembranair domein, een transmembranair domein en een cytoplasmatisch domein (Hatakeyama et al., 2010; Iwamoto en Mekada, 2006) (Figuur 9).



Figuur 9: Structuur van pro-HB-EGF.

Pro-HB-EGF is een type I transmembranair eiwit dat opgebouwd is uit 280 aminozuren. Door klieving van pro-HB-EGF via TACE/ADAM ter hoogte van het juxtamembranair domein ontstaat sHB-EGF (Iwamoto en Mekada, 2006).

Deze membraangebonden vorm van HB-EGF kan via juxtacriene signalisatie reeds activiteit uitoefenen op naburige cellen (Hatakeyama et al., 2010; Iwamoto en Mekada, 2006). Daarnaast kan pro-HB-EGF het difterie toxine binden wat resulteert in de opname van het toxine in het cytoplasma van de cel (Iwamoto en Mekada, 2006). Pro-HB-EGF wordt omgezet in oplosbaar HB-EGF (sHB-EGF) via ectodomein *shedding*. Tijdens dit proces wordt een GPCR geactiveerd, waardoor ADAM 9, 12, 10 of ADAM 17 (TNF α converterend enzym (TACE)) actief worden en pro-HB-EGF ter hoogte van het juxtamembranair domein gekliefd wordt (Figuur 10) (Hatakeyama et al., 2010; Iwamoto en Mekada, 2006; Nanba et al., 2003; Tanida et al., 2010). Dit sHB-EGF is een ligand voor receptoren van de EGF receptor familie en zal door rechtstreekse binding met EGFR en ErbB4 deze receptoren activeren. Via heterodimerisatie van deze receptoren met ErbB2 en ErbB3 kan sHB-EGF deze receptoren op een indirecte manier activeren. Daarnaast kan sHB-EGF ook bijdragen tot de transactivatie van EGFR via GPCR (Iwamoto en Mekada, 2006).



Figuur 10: Transactivatie van EGFR door ectodomein *shedding* van pro-HB-EGF.

Tijdens ectodomein *shedding* wordt ADAM, wat een membraangebonden metalloproteïnase is, geactiveerd door een actief GPCR. Dit actief ADAM gaat pro-HB-EGF ter hoogte van het juxtamembranair domein klieven, waardoor oplosbaar HB-EGF (sHB-EGF) en een carboxy-terminaal fragment van HB-EGF (HB-EGF-CTF) ontstaat. Het sHB-EGF zal binden met EGFR en deze receptor activeren, HB-EGF-CTF zal een translocatie naar de nucleus ondergaan (Blobel, 2005).

Na ectodomein *shedding* blijft het carboxy-terminaal fragment van HB-EGF (HB-EGF-CTF) achter. Dit omvat het transmembranair domein van pro-HB-EGF en wordt niet verder gekleefd door γ -secretase (Nanba et al., 2003). Vervolgens kan het HB-EGF-CTF een translocatie naar de nucleus ondergaan. Hier bindt het cytoplasmatisch domein van het pro-HB-EGF met promyelocyttaire leukemische *zinc finger* eiwitten (PLZF). PLZF onderdrukt de expressie van cycline A en fungeert hierdoor als negatieve regulator van de celcyclus (Hatakeyama et al., 2010; Shimura et al., 2012). Door de binding van het cytoplasmatisch domein van pro-HB-EGF met PLZF gaat PLZF de nucleus verlaten, waardoor de celcyclus verder gezet wordt (Hatakeyama et al., 2010). Daarnaast zal het cytoplasmatisch domein ook binden met B-cel lymfoma 6 (Bcl6), wat ook een negatieve regulator van de celcyclus is. Door deze binding wordt cycline D2 niet onderdrukt en kan de celcyclus verdergaan (Shimura et al., 2012). Daarnaast is in de literatuur beschreven dat HB-EGF EMT kan induceren door een activatie van FGFR, wat resulteert in een opregulatie van *Snail* (Hatakeyama et al., 2010; Smith et al., 2009). Door deze verschillende acties van sHB-EGF en HB-EGF-CTF fungeert HB-EGF als een mitogeen en als een chemoattractant voor fibroblasten, keratinocyten en gladde spiercellen. Hierdoor is HB-EGF betrokken bij verschillende fysiologische processen zoals wondheling, angiogenese en blastocystimplantatie. Maar ook pathologische processen zoals cardiale hypertrofie, tumorvorming en resistentie tegen chemotherapie worden beïnvloed door HB-EGF (Iwamoto en Mekada, 2006; Shimura et al., 2012).

1.6. Disintegrine en metalloproteïnase (ADAM)

ADAM is een membraangebonden metalloproteïnase dat behoort tot de superfamilie van de zinc proteïnases. Deze superfamilie wordt onderverdeeld in vijf subgroepen op basis van de primaire structuur van het katalytisch domein (Seals en Courtneidge, 2003). Eén van deze subgroepen is de metzincin subgroep die zelf nog onderverdeeld wordt in vier groepen. MMP behoren tot de matrixines. Deze metalloproteïnases bezitten enkel een metalloproteïnase domein en zorgen vooral voor afbraak van de ECM. Hierdoor zijn ze betrokken bij wondheling en ontwikkeling, maar ook in pathologische processen zoals artritis en kanker (Seals en Courtneidge, 2003). Adamalysines daarentegen, waartoe ADAM behoort, bezit naast een metalloproteïnase domein ook een disintegrine domein (Seals en Courtneidge, 2003). Naast deze domeinen bezit ADAM ook een N-terminale signaalsequentie, een pro-domein, een cysteine-rijke regio, een EGF gerelateerd domein, een transmembranair domein en een cytoplasmatische staart, welke fosforylatieplaatsen en proline-rijke regio's bezit waaraan signaalmoleculen die een SH3 domein bevatten kunnen binden (Figuur 11) (Blobel, 2005; Higashiyama et al., 2008).



Figuur 11: Structuur van ADAM.

ADAM is een membraangebonden metalloproteïnase dat opgebouwd is uit een N-terminale signaalsequentie, een pro-domein, een metalloproteïnase domein, een disintegrine domein, een cysteine-rijke regio, een EGF-gerelateerd domein, een transmembranair domein en een cytoplasmatische staart (Seals en Courtneidge, 2003).

De synthese van ADAM vindt plaats in het ruw endoplasmatisch reticulum (RER) van waaruit het getransporteerd wordt naar het Golgi-complex. Hier matureert het eiwit verder, wat een verlies van het pro-domein inhoudt door de activiteit van pro-proteïne convertase, welke ADAM inactief houdt na de synthese. Door het verlies van dit domein komt het katalytisch domein, het metalloproteïnase domein, vrij en wordt het ADAM actief (Blobel, 2005; Seals en Courtneidge, 2003). Activatie van ADAM kan ook gebeuren via GPCR-gerelateerde activatie of via fosforylatie van eiwitten in de cytoplasmatische staart. Dit resulteert in controle van de membraanfusie, vrijzetting van cytokines en groeifactoren en celmigratie. Hierdoor is ADAM betrokken bij fysiologische processen

(spierontwikkeling en fertilisatie) en bij pathologische processen (inflammatie en kanker) (Higashiyama et al., 2008; Seals en Courtneidge, 2003). Om de ontwikkeling van deze pathologische processen te voorkomen, moet de protease-activiteit van ADAM gereguleerd worden. Dit gebeurt door intrinsieke metalloproteïnase inhibitoren zoals weefsel inhibitoren van matrix metalloproteïnasen (TIMP), eiwitten in het pro-domein en het retentiesignaal in de cytoplasmatische staart, waardoor deze domeinen fungeren als regulatorische domeinen (Higashiyama et al., 2008; Seals en Courtneidge, 2003). Aangezien het katalytisch domein interageert met het disintegre domein en de cysteïne-rijke regio, hebben deze domeinen een effect op de verwijdering van het pro-domein (Blobel, 2005). ADAM kan op verschillende plaatsen in de cel voorkomen, maar voornamelijk de vorm aan het celoppervlak bezit een katalytische activiteit, omdat deze vorm sneller geactiveerd wordt (Seals en Courtneidge, 2003). De aanwezigheid van het retentiesignaal in de cytoplasmatische staart zorgt ervoor dat ADAM intracellulair gestockeerd blijft en minder katalytische activiteit vertoont (Seals en Courtneidge, 2003).

Van de 40 verschillende ADAM orthologen die gekend zijn, zijn er 21 humaan (Tanida et al., 2010). Twaalf van deze humane ADAM bezitten in hun metalloproteïnase domein een consensus sequentie (HEXGHXXGXXHD) specifiek voor het katalytisch domein (Blobel, 2005; Tanida et al., 2010). ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 28 en 33 bezitten naast deze consensus sequentie ook een proteolytische activiteit die verantwoordelijk is voor de klieving van EGFR liganden (Tanida et al., 2010).

Uit onderzoek is gebleken dat ADAM 9, 10, 12 en 17 betrokken zijn in de klieving van pro-HB-EGF en bijgevolg in de HB-EGF gerelateerde processen (Tanida et al., 2010).

1.7. Interleukine-8 (IL-8)

IL-8 (CXCL8) behoort tot de cysteïne-X-cysteïne chemokine (CXCL) familie en wordt geproduceerd door verschillende soorten cellen zoals neutrofielen, myoblasten, endotheel- en epitheelcellen (Itoh et al., 2005; Luppi et al., 2007; Tanida et al., 2010). Aangezien IL-8 een chemokine is, bezit het chemotactische functies waarbij het leukocyten gaat aantrekken naar de plaats van inflammatie en deze activeert. Dit proces zal leukocyt-endotheliale en -mesotheliale interacties beïnvloeden (Galffy et al., 1999; Itoh et al., 2005). Maar naast deze chemotactische functies bevordert IL-8 ook het angiogeneseproces, bevordert het tumorproliferatie en draagt het bij tot EMT (Jijon et al., 2012; Tanida et al., 2010). IL-8 kan zijn biologische functies uitvoeren na binding aan zijn receptoren (CXCR1 en CXCR2) of door transactivatie van CXCR4 en CXCR7, welke allemaal behoren tot de GPCR familie (Itoh et al., 2005; Singh en Lokeshwar, 2011). Door deze binding worden de receptoren geactiveerd, waardoor deze signaalmoleculen uitsturen die kunnen binden aan de cytoplasmatische staart van ADAM, wat leidt tot activatie van ADAM. Dit resulteert in ectodomein vrijzetting van pro-HB-EGF waardoor IL-8 celmigratie stimuleert (Itoh et al., 2005). Daarnaast kan IL-8 ook celproliferatie stimuleren door de transactivatie van EGFR via klieving van pro-HB-EGF (Itoh et al., 2005). Door de acties van IL-8 kan het immuunsysteem, dat normaal ingesteld is om tumorgroei te onderdrukken, toch bijdragen tot verhoogde tumorgroei en migratie (Luppi et al., 2007). Bovendien kunnen tumorcellen ook IL-8 vrijgeven, waardoor de tumor inflammatoire cellen gaat aantrekken die op hun beurt IL-8 gaan secreteren. Vervolgens gaat IL-8 EGFR activeren via transactivatie (Luppi et al., 2007; Zhang et al., 2012). Hierdoor ontstaat een vicieuze cirkel, aangezien activatie van EGFR resulteert in productie van IL-8 (Zhang et al., 2012). Bovendien gaan epitheelcellen meer IL-8 produceren in aanwezigheid van sigarettenrook, wat van roken, naast de andere mechanismen die sigarettenrook activeert, een risicofactor maakt voor onder andere HNSCC (Le Quement et al., 2008).

2. Hypothese en doelstellingen

In een voorgaand experiment werden de cetuximab-gevoelige HNSCC cellijnen SC263, LICR-HN2 en LICR-HN5 blootgesteld aan een toenemende concentratie cetuximab om cetuximab-resistente cellijnen te bekomen (verworven resistentie). Daarnaast werden deze cellijnen ook gedurende dezelfde periode blootgesteld aan PBS (vehicle-oplossing, negatieve controle op spontane genetische veranderingen). Na toediening van 15 nM cetuximab gedurende 13 uur werd van beide cellijntypes de genexpressie nagegaan via de microarray technologie. De analyse ervan toonde aan dat het ligand HB-EGF, het cytokine IL-8 en het peptidase ADAM 19 verhoogd tot expressie komen bij de resistente cellijnen in vergelijking met de sensitieve cellijnen. Als per cellijn gekeken werd, kwam dit genexpressiepatroon in de SC263 10.2 en LICR-HN5 9.1 cellijnen naar voren. Via een qRT-PCR werden voorgaande resultaten bevestigd.

Aangezien cetuximab het enige anti-EGFR therapeuticum is dat een FDA en EMEA goedkeuring heeft voor gebruik in de klinische praktijk bij HNSCC en de klinische resultaten vrij beperkt zijn omwille van resistentie, is het van groot belang om de onderliggende resistentiemechanismen te ontrafelen (Langer, 2008; Ratushny et al., 2009). Omdat in het voorgaand experiment HB-EGF verhoogd tot expressie kwam in de resistente cellijnen, wordt in deze thesis de rol van HB-EGF in de ontwikkeling van resistentie nagegaan. Dit gebeurt aan de hand van twee strategieën. In een eerste strategie wordt de betrokkenheid van HB-EGF in de ontwikkeling van resistentie nagegaan. Hiervoor worden cytotoxiciteitsexperimenten uitgevoerd met een neutraliserend antilichaam tegen sHB-EGF. Tijdens deze experimenten kan nagegaan worden of blokkade van sHB-EGF resulteert in het overwinnen van de verworven resistentie. Een tweede strategie is blokkade van ADAM via GM 6001, een ADAM inhibitor. ADAM zal HB-EGF klieven en sHB-EGF vormen, waardoor het mogelijk betrokken is in de ontwikkeling van resistentie. Daarom wordt nagegaan of blokkade van ADAM cytotoxische effecten heeft op de resistente cellijnen. Daarnaast is in de literatuur beschreven dat HB-EGF EMT kan induceren door activatie van FGFR en opregulatie van *Snail* (Hatakeyama et al., 2010; Smith et al., 2009). Bovendien draagt EMT bij tot de ontwikkeling van resistentie (Chen et al., 2010). Daarom wordt de migratoire capaciteit van de cetuximab-resistente cellijnen vergeleken met deze van de cetuximab-gevoelige cellijnen.

3. Materiaal en methoden

3.1. Cellijnen

In deze thesis werd gebruik gemaakt van drie HNSCC cellijnen: SC263, LICR-HN2 en LICR-HN5. SC263 is een HNSCC cellijn die bekomen is uit een humane hoofdhalstumor biopt (Begg et al., 2002). LICR-HN2 (Ludwig Institute for Cancer Research, Zürich, Zwitserland) is een HNSCC van de larynx en is afkomstig van een 49-jarige man. De tumor is een T3 N0 M0 geklasseerde tumor die weinig gedifferentieerd en niet metastatisch is. De voorbehandeling bestond uit radiotherapie gevolgd door een laryngectomie. Via karyotypering werd gezien dat LICR-HN2 hyperdiploïd is. Gemiddeld bezit een LICR-HN2 tumorcel 65 chromosomen (Easty et al., 1981). LICR-HN5 (Ludwig Institute for Cancer Research, Zürich, Zwitserland) is afkomstig van een 73-jarige man en is een HNSCC van de tong. Deze tumor is matig gedifferentieerd en is matig metastatisch. De voorbehandeling bestond uit chemo- en radiotherapie, hemiglossectomie en hemimandibulectomie. De tumor is een T2 N0 M0 geklasseerde tumor. Elektronenmicroscopie toonde aan dat LICR-HN5 veel desmosomen bevat tussen naburige cellen waardoor de intercellulaire ruimte klein werd. Bovendien zijn er cytoplasmatisch veel tonofilamenten waar te nemen (Easty et al., 1981).

3.1.1. Resistentie opwekken en in stand houden in de cellijnen

De drie bovengenoemde moedercellijnen zijn gevoelig voor cetuximab-therapie (IC_{50} waarden SC263 $0,13 \text{ nM} \pm 0,06$; LICR-HN2 $0,05 \text{ nM} \pm 0,01$; LICR-HN5 $0,43 \text{ nM} \pm 0,17$) en werden vervolgens resistent gemaakt. Hierbij werd elke cellijn in twee gesplitst, waarvan één van de twee subculturen werd behandeld met PBS (vehicle-oplossing). Dit resulteert in een cetuximab-gevoelige dochtercellijn. De andere subcultuur werd blootgesteld aan meerdere cetuximab dosisverdubbelingen. SC263 en LICR-HN2 ondergingen 10 dosisverdubbelingen terwijl LICR-HN5 9 dosisverdubbelingen toegediend kreeg. Door het stelselmatig toedienen van hogere concentraties cetuximab ontstonden er cetuximab-resistente dochtercellijnen.

Om de cetuximab-resistentie te behouden werden de cetuximab-resistente cellijnen om de 4 tot 6 weken opnieuw blootgesteld aan een dosis cetuximab volgens Tabel 1.

Tabel 1: Concentratie cetuximab die per cellijn om de 4-6 weken gegeven werd om de resistentie tegen cetuximab in stand te houden.

Cellijn	Concentratie cetuximab (nM)
LICR-HN5	110,0
LICR-HN2	25,58
SC263	66,67

3.2. Celcultuur

3.2.1. Kweekomstandigheden

Alle cellijnen zijn adherente cellijnen die in Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) (Life Technologies, Gent, België) gekweekt werden. Aan dit medium werd 10% foetaal kalfserum (FBS), 1% L-glutamine en 1% penicilline/streptomycine (Life Technologies, Gent, België) toegevoegd. Voor het serumvrij medium werden alle supplementen behalve FBS toegevoegd aan het medium. Het medium werd bij 4°C bewaard en voor gebruik in een warmwaterbad opgewarmd tot 37°C.

De cellen werden gekweekt in steriele 25 cm³ (T25) of 75 cm³ (T75) cultuurflessen (Greiner Bio-One, Wommel, België) die in een incubator (Binder, Venray, Nederland) bij 37°C en 5% CO₂ werden geplaatst.

Om de 6 maanden werden de cellen gecontroleerd op mycoplasma besmettingen met behulp van de MycoAlert Mycoplasma detection kit (Lonza, Verviers, België)

3.2.2. Bereiden celsuspensies en passeren van cellen

Celgroei wordt gekenmerkt door initieel een lag-fase waarin de cellen weinig of niet delen. Deze fase wordt gevolgd door een log-fase waarbij er exponentiële groei optreedt van de cellen. Uiteindelijk bereikt de celgroei een plateaufase die veroorzaakt wordt door contactinhibitie en gekenmerkt

wordt door een verminderde celgroei. Om deze laatste fase te voorkomen moet een deel van de cellen op regelmatige basis gepasseerd worden naar een nieuwe cultuurfles. Hiervoor werd het oud medium verwijderd en werden de cellen gewassen met 1x PBS. Deze wasstap is nodig om restanten van het medium te verwijderen aangezien deze trypsine gaan inactiveren. De PBS-oplossing werd afgezogen en trypsine (Life Technologies, Gent, België) werd toegevoegd. Voor een T25 cultuurfles werd 1 ml trypsine toegevoegd, voor een T75 cultuurfles 2 ml. Nadien werd de cultuurfles voor 2 minuten in de incubator geplaatst en via microscopische detectie werd nagegaan of de cellen in suspensie zijn. Vervolgens werd nieuw medium toegevoegd tot een volume van 10 ml en werden de cellen naar een nieuwe cultuurfles overgebracht in de gewenste verdunning.

Ook voor het bereiden van celsuspensies voor experimenten werden de cellen getrypsiniseerd. Dit gebeurde op dezelfde wijze, maar nadien werden de cellen overgebracht in tubes om de gewenste celconcentratie te verkrijgen met behulp van een semi-automatische celtelling met een Scepter 2.0 (Merck Millipore, Overijse, België).

Trypsine werd bewaard bij -18°C en voor gebruik werd het opgewarmd tot 37°C met behulp van een warmwaterbad.

Voor de bereiding van celsuspensies voor de migratietesten werd TrypLE Express™ (Invitrogen, Gent, België) gebruikt. Dit is een recombinant enzyme dat dezelfde werking heeft als dierlijk trypsine. Het voordeel van TrypLE Express™ is dat het minder agressief is voor de cellen waardoor er minder celschade optreedt. TrypLE Express™ moet, in tegenstelling tot trypsine, niet geïnhibeerd worden met FBS wat het bereiden van celsuspensies vereenvoudigt (Life Technologies, 2013).

TrypLE Express™ werd voor gebruik opgewarmd tot 37°C met behulp van de incubator en werd bewaard bij 4°C. Verder is het gebruik van trypLE Express™ gelijk aan deze van trypsine.

3.3. Compounds

3.3.1. Cetuximab

Cetuximab (Merck, Brussel, België) werd bij 4°C bewaard aan een stockconcentratie van 13719 nM en werd verder verdund in PBS.

3.3.2. HB-EGF antilichaam

Het HB-EGF antilichaam (R&D Systems, Minneapolis, USA) is een monoklonaal IgG_{2A} muisantilichaam dat gericht is tegen humaan HB-EGF. Het aangekocht antilichaam werd uitverdeeld aan een concentratie van 0,5 mg/ml in steriel PBS. De aliquots werden bewaard bij -18°C (6 maanden stabiel) en het aliquot dat in gebruik is werd bij 4°C (1 maand stabiel) bewaard.

3.3.3. ADAM inhibitor (GM 6001)

GM 6001 (Galardin, Ilomastat) (Enzo Life Sciences, Antwerpen, België) is een breed-spectrum inhibitor van MMP en inhibeert ook ADAM 19. De inhibitor werd opgelost in dimethylsulfoxide (DMSO) aan een concentratie van 50 mM en uitverdeeld in aliquots die bewaard werden bij -20°C waardoor de inhibitor 1 jaar stabiel blijft.

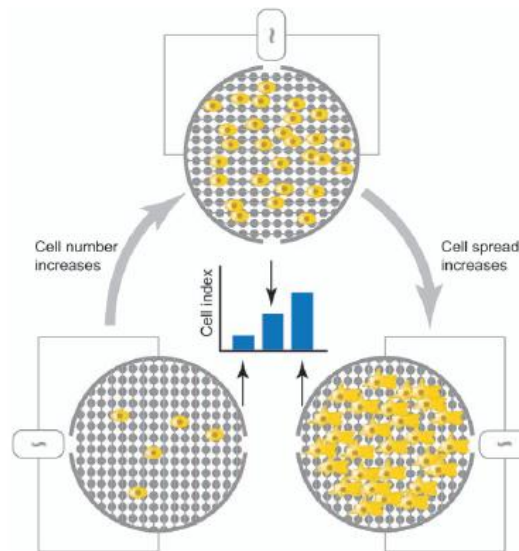
3.4. xCELLigence

Via het xCELLigence *real time cell analysis* (RTCA) systeem (Roche Applied Science, Vilvoorde, België) kan de celviabiliteit, het celaantal en de morfologie van de cellen worden nagegaan op een niet-invasieve en labelvrije methode door karakterisatie van impedantieverschillen (Limame et al., 2012). Dankzij de *real time* detectie kunnen zowel korte als lange termijnseffecten onderzocht worden wat met éénpunts-detectiemethoden niet mogelijk is (Atienza et al., 2006).

In deze thesis werd het xCELLigence systeem gebruikt voor proliferatietesten en cytotoxiciteitstesten. Aangezien de inhiberende concentratie van GM 6001 niet gekend is, werd met behulp van het xCELLigence systeem deze concentratie bepaald. Afhankelijk van deze concentratie worden de verdere cytotoxiciteitstesten uitgevoerd met het xCELLigence systeem of met de SRB-assay.

3.4.1. Principe

Op de bodem van een elektronische microtiterplaat (E-plaat) bevinden zich gouden elektroden. Deze plaat wordt in een elektronische analyzer gebracht die zich in de incubator (bij 37°C en 5% CO₂) bevindt. De analyzer gaat een elektrisch signaal van lage voltage (<20 mV) uitsturen naar de E-plaat zodat er een elektrisch veld ontstaat tussen de gouden elektroden. Wanneer adherente cellen gaan interageren met de elektroden treedt er een impedantieverschil op. Dit impedantieverschil wordt weergegeven als de celindex (CI, dimensieloos) en is proportioneel met het celaantal, de celmorfologie en de adhesieve karakteristieken van de cel (Figuur 12) (Abassi et al., 2009; Atienza et al., 2006).



Figuur 12: Het principe van het xCELLigence RTCA systeem.

Op de bodem van een E-plaat bevinden zich gouden elektroden waartussen een elektrisch veld wordt opgebouwd door het toedienen van een elektrisch signaal. Door de aanhechting, proliferatie of morfologische verandering van cellen treedt er een impedantiewijziging op die gedetecteerd wordt en weergegeven wordt als de cel index. Deze waarde geeft informatie over het celaantal, de adhesieve capaciteiten en de morfologie van de cel (Limame et al., 2012).

3.4.2. Protocol proliferatietesten

In een E-plaat 16 (Roche Diagnostics Belgium, Vilvoorde, België) werd 100 µl FBS bevattend medium toegevoegd. Rondom de wells werd steriel water aangebracht wat verdamping van het medium voorkomt. Nadien werd gedurende 30 minuten de E-plaat geïncubeerd in de laminaire flowkast. Vervolgens werd de plaat in het xCELLigence toestel geplaatst om een backgroundmeting uit te voeren. Na het trypsiniseren en tellen van de cellen werden de celconcentraties aangemaakt. Voor de proliferatietesten werden 400, 800, 1600, 2000, 4000, 8000 en 16000 cellen in 50 µl uitgeplaat in de wells. Twee wells fungeren als controle en bevatten enkel medium. Vervolgens werd de plaat gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd in de laminaire flowkast. Nadien werd de E-plaat in het xCELLigence toestel geplaatst voor een run van 168u waarbij om de 30 minuten een meting van de impedantie plaatsvond.

3.4.3. Protocol cytotoxiciteitstesten

Voor de cytotoxiciteitstesten werd bovenstaand protocol gebruikt waarbij de uit te platen celconcentratie bepaald werd uit voorgaande proliferatie-experimenten. Deze celconcentratie geeft over het te meten tijdstip een exponentiële groei (Tabel 2). Na de aanhechtingsperiode van ongeveer 24u werd de meting onderbroken en werd 30 µl compound toegevoegd. De E-plaat werd opnieuw in het xCELLigence toestel geplaatst voor een incubatieperiode van 72u waarbij er om de 15 minuten een meting van de impedantie plaatsvond.

Tabel 2: Gebruikte celconcentratie per well en per cellijn voor de cytotoxiciteitstesten.

Cellijn	Aantal cellen per well
SC263R	6000
LICR-HN2R	10000
LICR-HN5R	7000

3.4.3.1. Combinatietherapie HB-EGF antilichaam en cetuximab

Voor de combinatietherapie van het HB-EGF antilichaam en cetuximab werd cetuximab aan een vaste concentratie van 15 nM toegediend terwijl het HB-EGF antilichaam aan verschillende concentraties werd toegediend volgens Tabel 3. Vier wells, waarvan er twee enkel PBS en twee enkel cetuximab bevatten, werden als controle wells gebruikt.

Tabel 3: Verschillende behandelingen gebruikt voor de cytotoxiciteitstesten van het HB-EGF antilichaam.

Verschillende behandelingen:	
PBS controle	15 nM cetuximab
0,01 µg/ml HB-EGF + 15 nM cetuximab	0,1 µg/ml HB-EGF + 15 nM cetuximab
0,5 µg/ml HB-EGF + 15 nM cetuximab	1 µg/ml HB-EGF + 15 nM cetuximab
2,5 µg/ml HB-EGF + 15 nM cetuximab	5 µg/ml HB-EGF + 15 nM cetuximab

3.4.3.2. GM 6001 in mono- en combinatietherapie met cetuximab

GM 6001 werd na een incubatieperiode van 24u toegediend aan verschillende concentraties (Tabel 4). Cetuximab werd toegediend aan een vaste concentratie van 15 nM. Aangezien GM 6001 opgelost is in DMSO, werd er aan twee wells enkel DMSO toegevoegd aan dezelfde verdunningsfactor als de hoogste concentratie van de inhibitor die toegevoegd werd om eventuele artefacten van het gebruik van DMSO uit te sluiten.

Tabel 4: Verschillende behandelingen gebruikt voor de cytotoxiciteitstesten van GM 6001.

Verschillende behandelingen:	
DMSO controle	15 nM cetuximab
10 µM GM 6001	25 µM GM 6001
50 µM GM 6001	10 µM GM 6001 + 15 nM cetuximab
25 µM GM 6001 + 15 nM cetuximab	50 µM GM 6001 + 15 nM cetuximab

3.5. Transwell

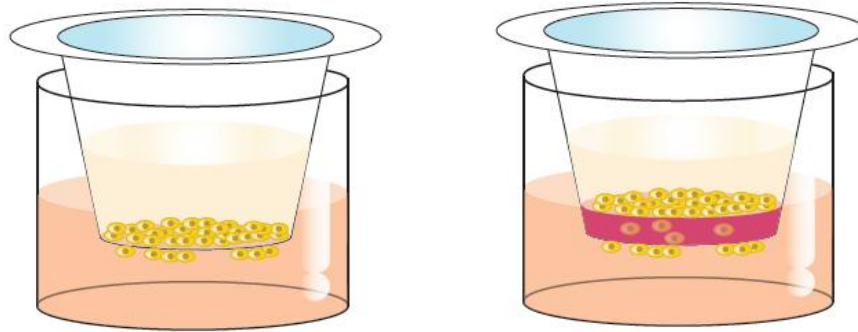
Met behulp van het Transwell systeem (Corning, Amsterdam, Nederland) wordt het migratoir karakter van een cellijn bestudeerd.

3.5.1. Principe

Het Transwell systeem werd voor het eerst beschreven door Boyden et al. in 1962. Hierbij werd een well onderverdeeld in 2 compartimenten via een filtermembraan dat poriën bezit met een poriegrootte die ervoor zorgt dat cellen enkel het andere compartiment kunnen bereiken door actieve migratie (Figuur 13). Vervolgens worden het aantal gemigreerde cellen bepaald door het filtermembraan te fixeren, kleuren en microscopisch te analyseren (Boyden, 1962). Dit in tegenstelling tot andere migratie-assays (zoals de scratch-assay) waarbij vaak niet duidelijk is of het wel degelijk om migratie gaat of om proliferatie van omringende cellen.

Het Transwell systeem dat in deze thesis gebruikt wordt bestaat uit 24 wells waarvan 12 wells een insert bezitten met een diameter van 6,5 mm. De insert bezit een poreus polycarbonaat membraan met poriën van 8 µm diameter.

Voor invasietesten wordt hetzelfde Transwell systeem gebruikt. Alleen wordt hier op de poreuze polycarbonaat membraan een laag Matrigel aangebracht welke fungeert als ECM.



Figuur 13: Schematische weergave van het Transwell systeem. Links een migratietest, rechts een invasietest.
 Door de aanwezigheid van een poreus polycarbonaat membraan met poriën van 8 µm ontstaat er een bovenste en onderste compartiment. In het bovenste compartiment worden de cellen geladen en in het onderste compartiment zit een chemoattractant. De cellen moeten actief migreren om de onderkant van de membraan te bereiken. Voor de invasietest wordt er een laag Matrigel aangebracht op de membraan welke fungeert als ECM (Limame et al., 2012).

3.5.2. Protocol migratie

In deze studie werd het migratoir karakter van 6 HNSCC cellijnen, 3 cetuximab-sensitieve en 3 cetuximab-gevoelige, bestudeerd in twee condities (serumvrij en niet-serumvrij) (Tabel 5).

Tabel 5: Gebruikte cellijnen voor de migratietesten.

Cetuximab-resistente cellijnen	Cetuximab-gevoelige cellijnen
SC263 10.2 (SC263R)	SC263 PBS (SC263S)
LICR-HN2 10.3 (LICR-HN2R)	LICR-HN2 PBS1 (LICR-HN2S)
LICR-HN5 9.1 (LICR-HN5R)	LICR-HN5 PBS2 (LICR-HN5S)

Indien de conditie “serumvrij” was, werden de cellen vier uur voor het inzetten van de migratie serumvrij gezet. Hiervoor werd het oorspronkelijk medium afgezogen en werden de cellen gewassen met 1x PBS. Vervolgens werd serumvrij medium toegevoegd en werden de cellen opnieuw in de incubator bij 37°C en 5% CO₂ geplaatst.

Eerst werd 600 µl serumbevattend medium via de openingen in de inserts in het onderste compartiment gebracht. Vervolgens werd de gewenste celconcentratie (2.10⁵ cellen per insert) gemaakt in serumvrij medium. In de inserts werd 250 µl celsuspensie gebracht en nadien gedurende 24u geïncubeerd in de incubator bij 37°C en 5% CO₂. Vervolgens werden de cellen gefixeerd en aangekleurd. Daarvoor werd het bovenste compartiment leeggezogen en werden de inserts gedurende 3 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur in 600 µl 0,1% kristalviolet in 20% methanol. Overtollige kleurstof werd verwijderd door de inserts te wassen in gedestilleerd water en met behulp van een wattenstaafje werden de cellen op de bovenkant van het membraan verwijderd. De wells werden overnacht en in het donker bij kamertemperatuur gedroogd.

Met behulp van een lichtmicroscop (Leica DMBR, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Duitsland) waaraan een AxioCam HRC camera (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Duitsland) is bevestigd werden foto's genomen met een 10x objectief- en 10x oculairvergroting van de inserts die nadien met ImageJ geanalyseerd werden.

3.6. Statistiek

3.6.1. Migratietesten

Bij de statistische analyse worden de resultaten die bekomen worden via ImageJ vergeleken per conditie (serumvrij of serumbevattend) en per cellijn (resistent of sensitief). Voor beide analyses wordt een Mann Whitney U test gebruikt. De resultaten zijn significant als $p < 0,05$.

3.6.2. Cytotoxiciteitstesten

Het neutraliserend antilichaam voor sHB-EGF werd enkel in combinatietherapie met cetuximab getest. Om na te gaan of er binnen een cellijn een significant effect bereikt wordt, wordt een One sample T-test gebruikt.

GM 6001 werd in mono- en combinatietherapie met cetuximab gebruikt. Om beide therapieën met elkaar te vergelijken binnen een cellijn wordt een Mann Whitney U test gebruikt. De resultaten zijn statistisch significant als $p < 0,05$.

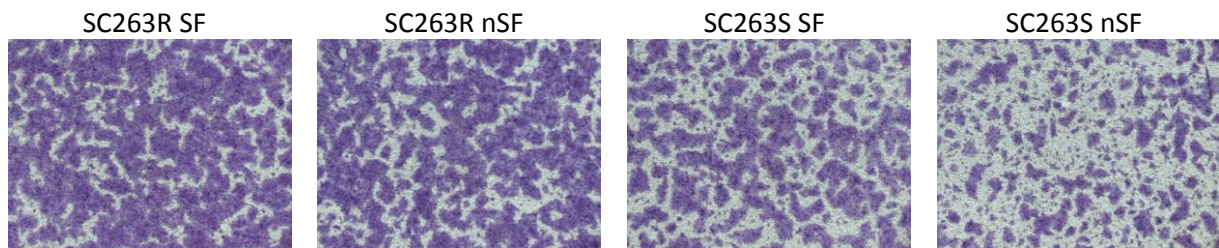
4. Resultaten

4.1. Migratietesten

Aangezien EMT kan bijdragen aan de ontwikkeling van resistentie en HB-EGF EMT kan induceren, wordt de migratoire capaciteit van de resistente en sensitieve cellijnen met elkaar vergeleken. De migratoire capaciteit wordt bestudeerd in serumbevattende en serumvrije condities.

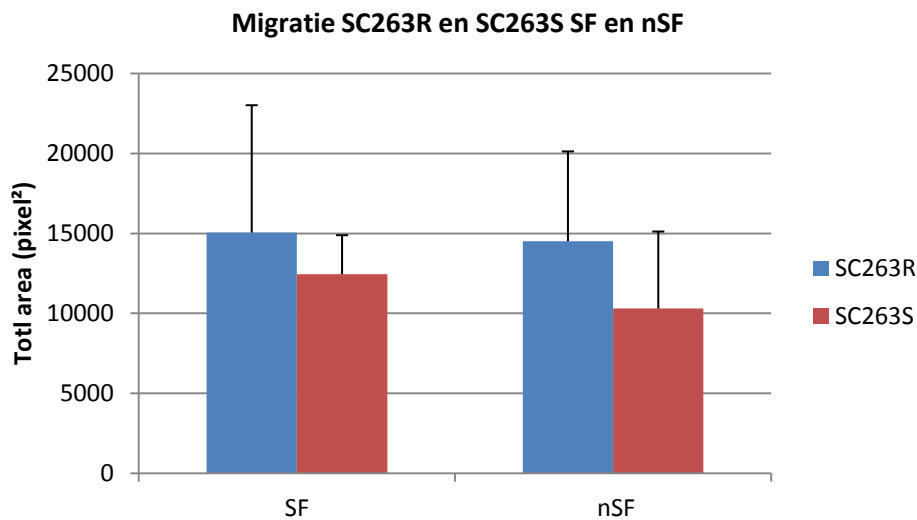
4.1.1. SC263R en SC263S

Met behulp van ImageJ werden de foto's in Figuur 14 geanalyseerd. Dit resulteerde in absolute waarden van de *total area* uitgedrukt in pixels² (Figuur 15). De analyse toont aan dat SC263R meer migreert dan SC263S, zowel in de serumvrije (respectievelijk 15059 pixels² ± 7965,534 en 12451 pixels² ± 2442,712) als in de serumbevattende conditie (respectievelijk 14514 pixels² ± 5621,359 en 10300 pixels² ± 4823,53). Er wordt dus een stijging van de migratie waargenomen in de serumvrije en serumbevattende conditie van respectievelijk 20,95% en 40,91%. Toch wordt er geen significant resultaat bekomen voor de migratie van beide cellijnen ($p=0,337$). Als beide condities met elkaar vergeleken worden, stelt men vast dat het serum geen invloed heeft op de resultaten ($p=0,749$).



Figuur 14: Microscopische foto's van de migratie van SC263R en SC263S, SF en nSF.

Deze microscopische foto's werden genomen na fixatie en aankleuring van de gemigreerde cellen. SC263R migreert in beide condities meer dan SC263S.

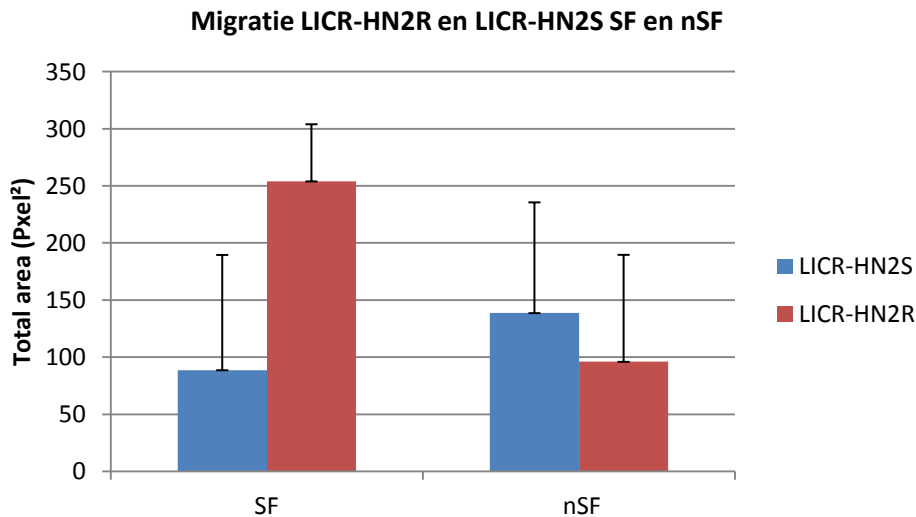


Figuur 15: Migratie van SC263R en SC263S SF en nSF.

Analyse met behulp van ImageJ toont aan dat SC263R meer migratoir is dan SC263S, zowel in serumvrije (15059 pixels² ± 7965,534 en 12451 pixels² ± 2442,712 respectievelijk) als in serumbevattende conditie (14514 pixels² ± 5621,359 en 10300 pixels² ± 4823,53 respectievelijk).

4.1.2. LICR-HN2R en LICR-HN2S

Na analyse van de foto's met behulp van ImageJ werd waargenomen dat de resistente LICR-HN2 10.3 cellijn (LICR-HN2R) meer migreert dan sensitieve LICR-HN2 PBS1 cellijn (LICR-HN2S) in de serumvrije conditie (respectievelijk $254 \text{ pixels}^2 \pm 50,09$ en $88,67 \text{ pixels}^2 \pm 100,98$). In de serumbevattende conditie migreert LICR-HN2S meer dan LICR-HN2R (respectievelijk $138,67 \text{ pixels}^2 \pm 97,03$ en $96 \text{ pixels}^2 \pm 93,74$) (Figuur 16). Deze resultaten zijn echter niet significant ($p=0,337$). Wegens de lage absolute waarden voor de *total area* kan gesteld worden dat zowel LICR-HN2R als LICR-HN2S een lage migratoire capaciteit bezitten. Statistische analyse toont aan dat het serum geen effect heeft op de migratoire capaciteit ($p=0,423$).

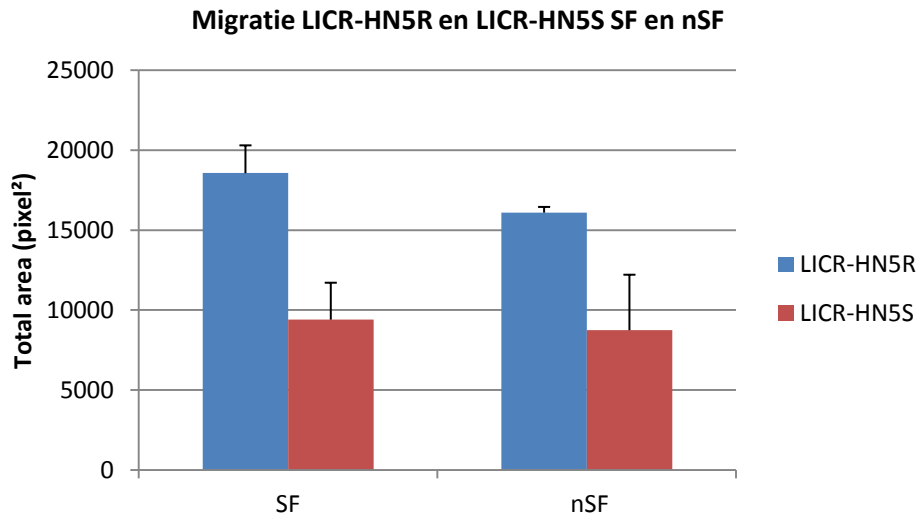


Figuur 16: Migratie van LICR-HN2R en LICR-HN2S, SF en nSF.

LICR-HN2R ($254 \text{ pixels}^2 \pm 50,09$) migreert onder serumvrije conditie meer dan LICR-HN2S ($88,67 \text{ pixels}^2 \pm 100,98$). Onder serumbevattende conditie migreert LICR-HN2S ($138,67 \text{ pixels}^2 \pm 97,03$) meer dan LICR-HN2R ($96 \text{ pixels}^2 \pm 93,74$). De absolute waarden voor de *total area* liggen zeer laag wat betekent dat zowel LICR-HN2R als LICR-HN2S weinig migratie vertonen.

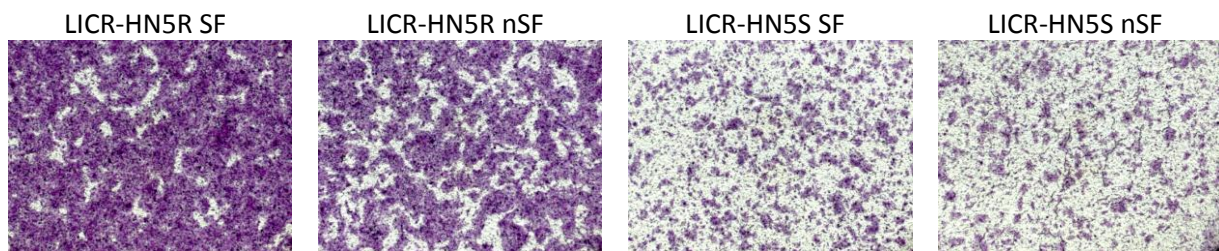
4.1.3. LICR-HN5R en LICR-HN5S

Figuur 17 toont de migratie van de resistente LICR-HN5 9.1 cellijn (LICR-HN5R) en de sensitieve LICR-HN5 PBS2 cellijn (LICR-HN5S) in zowel de serumvrije als de serumbevattende conditie en werd gegenereerd na analyse van de foto's in Figuur 18 met behulp van ImageJ. Uit de figuur kan afgeleid worden dat LICR-HN5R meer migreert dan LICR-HN5S, zowel in de serumvrije (respectievelijk $18571 \text{ pixels}^2 \pm 1742,844$ en $9412 \text{ pixels}^2 \pm 2309,98$) als in de serumbevattende conditie (respectievelijk $16106 \text{ pixels}^2 \pm 356,612$ en $8750 \text{ pixels}^2 \pm 3472,618$). Er wordt een stijging van de migratie waargenomen in de serumvrije en serumbevattende conditie van 97,31% en 84,07%. De statistische analyse toont aan dat LICR-HN5R significant meer migreert dan LICR-HN5S ($p=0,004$). Het al dan niet serumvrij zetten van de cellen heeft geen significant effect op de migratoire capaciteit van beide cellijnen ($p=0,337$).



Figuur 17: Migratie van LICR-HN5R en LICR-HN5S, SF en nSF.

De LICR-HN5R cellijn migreert meer dan LICR-HN5S, zowel in de serumvrije (respectievelijk $18571 \text{ pixels}^2 \pm 1742,844$ en $9412 \text{ pixels}^2 \pm 2309,98$) als in de serumbevattende conditie (respectievelijk $16106 \text{ pixels}^2 \pm 356,612$ en $8750 \text{ pixels}^2 \pm 3472,618$).



Figuur 18: Microscopische foto's van de migratie van LICR-HN5R en LICR-HN5S SF en nSF.

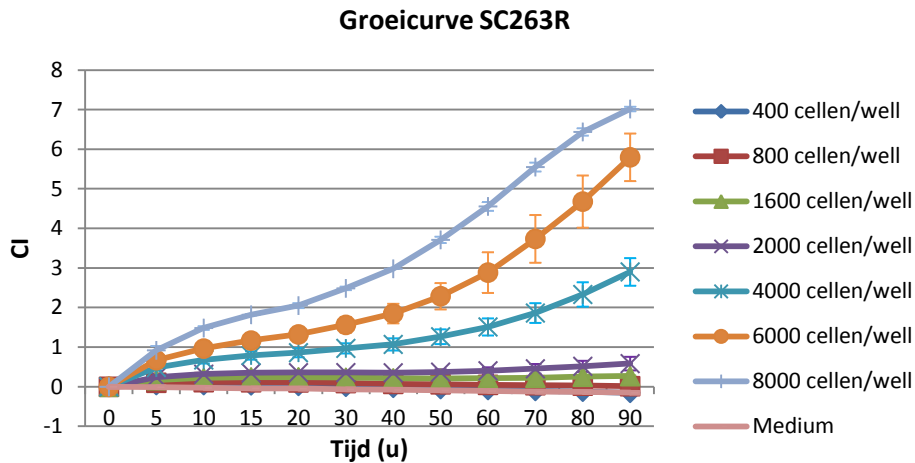
Deze microscopische foto's werden bekomen na fixatie en aankleuring van de gemigreerde cellen. LICR-HN5R migreert meer dan LICR-HN5S, zowel in de serumvrije (respectievelijk $18571 \text{ pixels}^2 \pm 1742,844$ en $9412 \text{ pixels}^2 \pm 2309,98$) als in de serumbevattende conditie (respectievelijk $16106 \text{ pixels}^2 \pm 356,612$ en $8750 \text{ pixels}^2 \pm 3472,618$).

4.2. Proliferatietesten

Tijdens de cytotoxiciteitstesten ondergaan de cellen na 24u aanhechting een behandeling van 72u. Gedurende deze periode moet er een exponentiële groei van de cellen aanwezig zijn. Hiertoe moet de cellijn aan een specifieke concentratie uitgeplaat worden die deze exponentiële groei waarborgt. Deze concentratie wordt bepaald aan de hand van een proliferatietest die uitgevoerd wordt op het *real time* xCELLigence systeem.

4.2.1. SC263R

Onderstaande grafiek (Figuur 19) geeft de proliferatie van SC263R weer. Bij een concentratie lager dan 4000 cellen/well wordt er geen exponentiële fase bereikt en blijven de cellen in de lagfase. Een concentratie van 4000 cellen/well resulteert in een exponentiële groei tot 90u na het uitplaten van de cellen. Bij een concentratie vanaf 8000 cellen/well begint de curve bij 90u af te vlakken en wordt de plateau fase bereikt. Rekening houdend met de resultaten van deze test wordt de cellijn aan een concentratie van 6000 cellen/well uitgeplaat voor de cytotoxiciteitstesten.

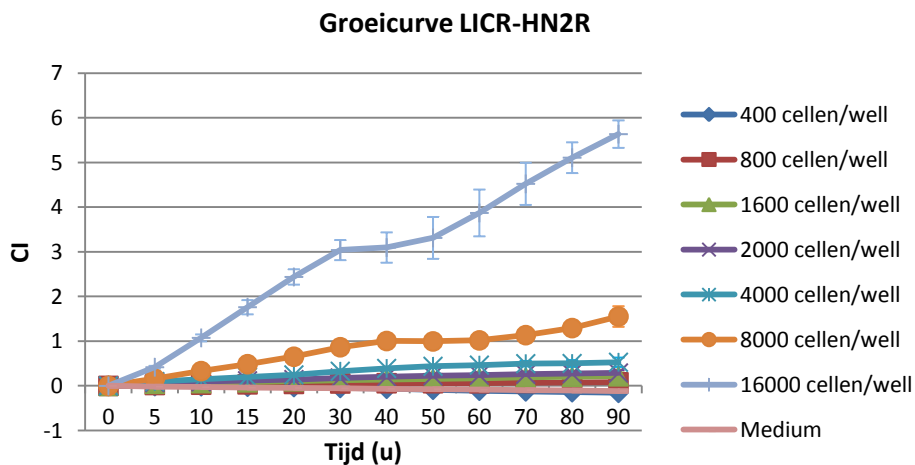


Figuur 19: Proliferatiecurve van SC263 10.2.

Bij een concentratie van 4000 cellen/well wordt er nog exponentiële groei waargenomen bij 90u. Bij een concentratie van 8000 cellen/well begint de curve af te vlakken bij 90u en wordt de plateau fase bereikt. Een concentratie lager dan 4000 cellen/well resulteert in een lange lag-fase en het niet bereiken van een exponentiële fase.

4.2.2. LICR-HN2R

De proliferatiecurve van LICR-HN2R (Figuur 20) toont aan dat bij een concentratie van 8000 cellen/well een lichte exponentiële fase bekomen wordt na 90u. Een concentratie van 16000 cellen/well geeft een sterke exponentiële groei bij 90u. Bij een lagere concentratie dan 8000 cellen/well wordt geen exponentiële groei bereikt en blijven de cellen in de lag-fase. Omwille van deze resultaten wordt LICR-HN2R uitgeplaat aan een concentratie van 10000 cellen/well voor de cytotoxiciteitstesten.

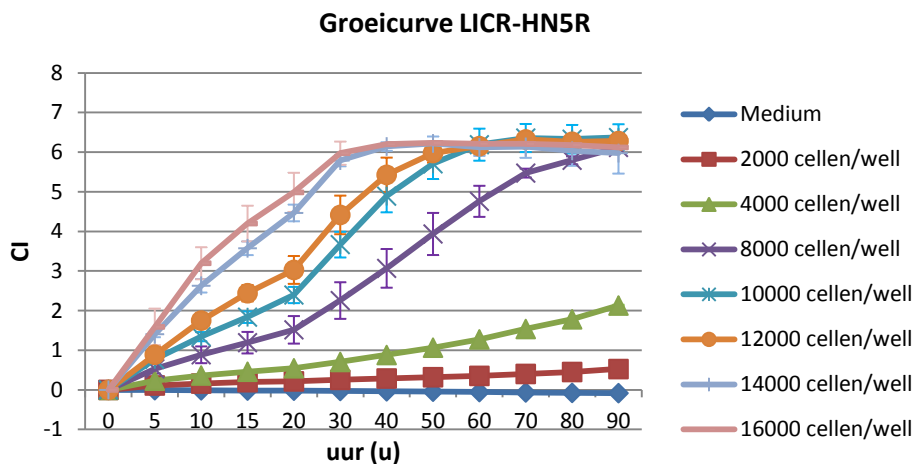


Figuur 20: Proliferatiecurve van LICR-HN2R.

Bij een concentratie van 8000 cellen/well wordt een lichte exponentiële groei waargenomen 90u na het uitplaten van de cellen. Een concentratie lager dan 8000 cellen/well bereikt geen exponentiële fase na 90u. Bij een concentratie van 16000 cellen/well wordt nog een sterke exponentiële groei waargenomen na 90u.

4.2.3. LICR-HN5R

Onderstaande grafiek (Figuur 21) toont aan dat een concentratie lager dan 4000 cellen/well geen exponentiële groei geeft na 90u. De cellen blijven gans het experiment in de lag-fase. Bij een concentratie van 4000 cellen/well kan exponentiële groei waargenomen worden na 90u. Vanaf een concentratie van 8000 cellen/well begint de curve af te vlakken na 70u en wordt de plateau fase bereikt. Aan de hand van deze resultaten werd gekozen om tijdens de cytotoxiciteitsexperimenten een concentratie van 7000 cellen/well uit te platen voor LICR-HN5R.



Figuur 21: Proliferatiecurve van LICR-HN5R.

Bij een concentratie van 4000 cellen/well wordt een exponentiële groei waargenomen na 90u. Vanaf 8000 cellen/well begint de curve na 90u af te vlakken en wordt de plateau fase bereikt. Bij een lagere concentratie dan 4000 cellen/well wordt geen exponentiële groei bekomen en blijven de cellen in de lag-fase.

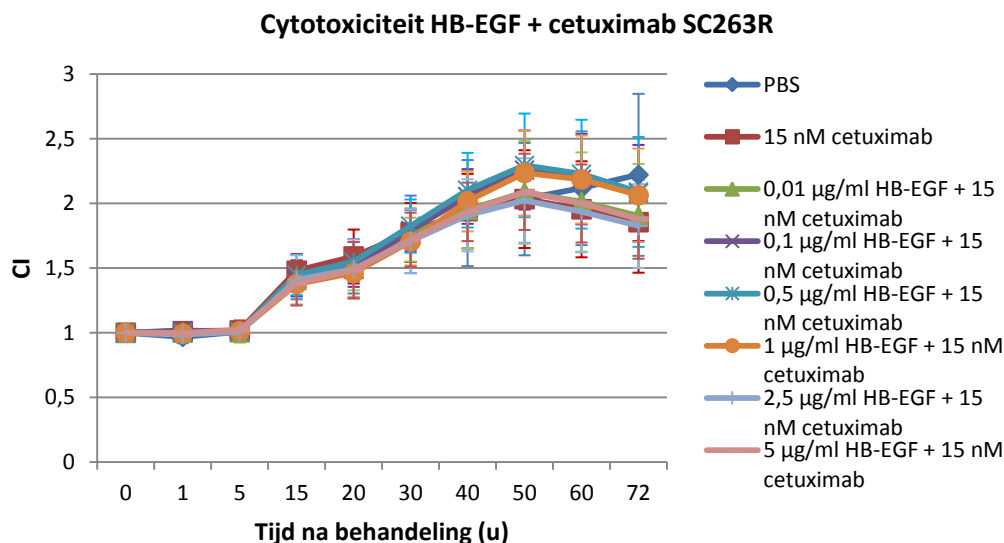
4.3. Cytotoxiciteitstesten

4.3.1. HB-EGF antilichaam

Aangezien voorgaand onderzoek aangetoond heeft dat HB-EGF verhoogd tot expressie komt in resistente HNSCC cellijnen, wordt de rol van deze ligand in de ontwikkeling van resistentie nagegaan. Dit gebeurt aan de hand van een cytotoxiciteitstest waarbij een neutraliserend antilichaam voor sHB-EGF in verschillende concentraties toegevoegd wordt aan de resistente cellijnen. Het antilichaam wordt in combinatie met 15 nM cetuximab toegediend.

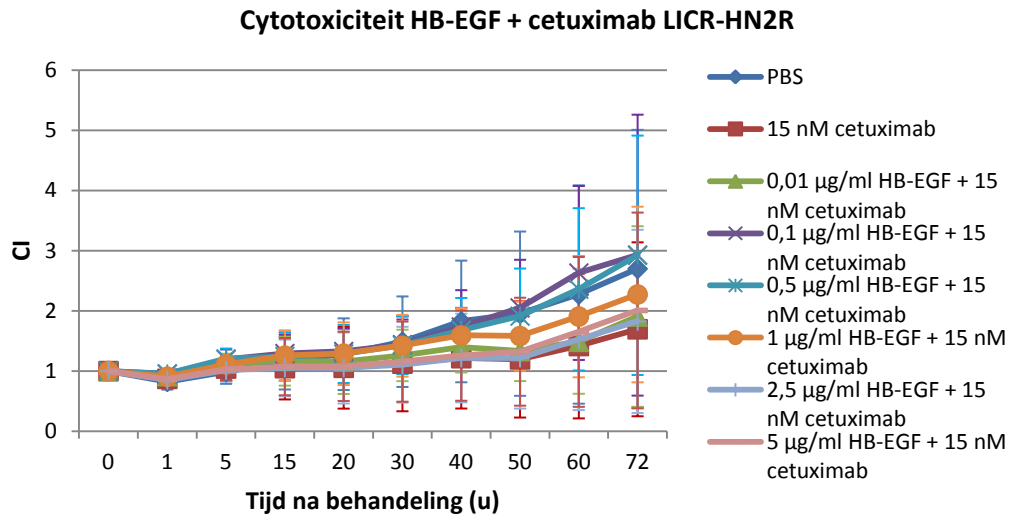
4.3.1.1. SC263R, LICR-HN2R en LICR-HN5R

Figuur 22, Figuur 23 en Figuur 24 zijn de curven opgesteld na drie cytotoxiciteitsexperimenten van respectievelijk SC263R, LICR-HN2R en LICR-HN5R. Bij deze drie cetuximab-resistente cellijnen wordt bij de hoogste concentratie van het neutraliserend antilichaam tegen sHB-EGF (5 µg/ml) geen effect waargenomen. Hieruit blijkt dat blokkade van sHB-EGF samen met cetuximab niet volstaat om de cetuximab-resistentie te niet te doen.

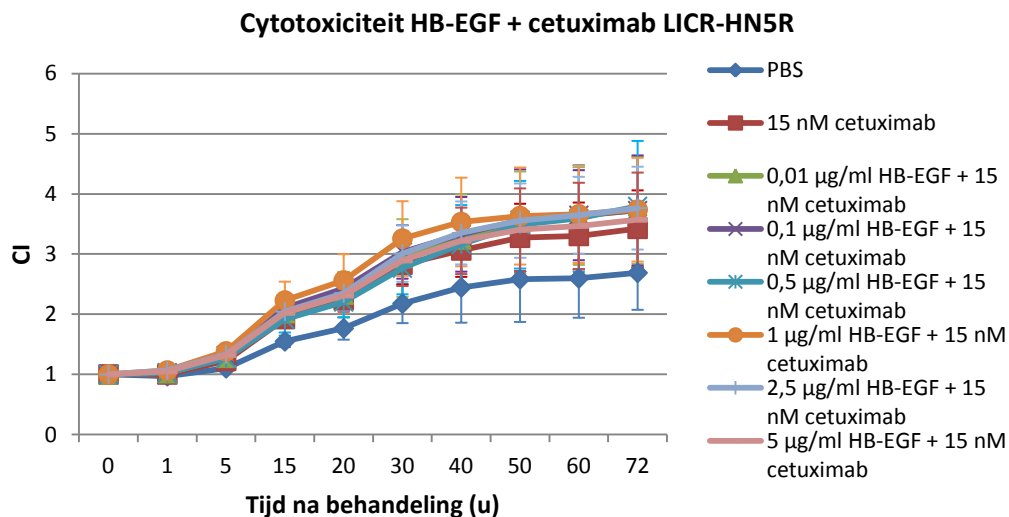


Figuur 22: Cytotoxiciteitscurve van de combinatietherapie van HB-EGF met cetuximab voor SC263R.

Bij geen enkele concentratie van het antilichaam wordt een verminderde groei van SC263R waargenomen.



Figuur 23: Cytotoxiciteitscurve van het antilichaam tegen HB-EGF in combinatie met cetuximab voor LICR-HN2R. Bij geen enkele concentratie van het antilichaam werd een verminderde celgroei waargenomen.



Figuur 24: Cytotoxiciteitscurve van het antilichaam tegen HB-EGF in combinatie met cetuximab voor LICR-HN5R. Geen enkele concentratie van het antilichaam zorgt voor een verminderde celgroei van LICR-HN5R.

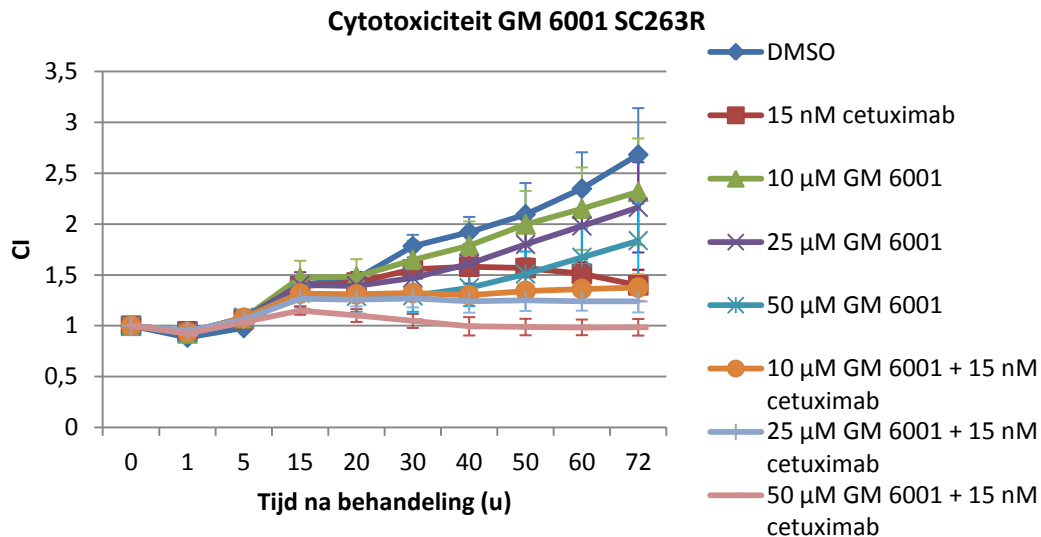
4.3.2. ADAM inhibitor (GM 6001)

In een voorgaand experiment werd aangetoond dat het peptidase ADAM 19 verhoogd tot expressie komt in de cetuximab-resistente cellijnen (SC263R en LICR-HN5R). Hierdoor zou dit peptidase een rol kunnen spelen in de ontwikkeling van verworven resistentie tegen EGFR doelgerichte therapie in HNSCC. Om dit na te gaan werden de drie cetuximab-resistente cellijnen blootgesteld aan verschillende concentraties GM 6001, een ADAM inhibitor. De inhibitor werd ook in een combinatietherapie met cetuximab getest om na te gaan of de resistentie tegen cetuximab overwonnen kan worden. De experimenten werden uitgevoerd met behulp van het *real time* xCELLigence systeem. Door tijdsgebrek werd enkel SC263R en LICR-HN2R getest.

4.3.2.1. SC263R

Onderstaande figuur toont de cytotoxiciteit van GM 6001 in mono- en in combinatietherapie met cetuximab bij SC263R (Figuur 25). Hier kan gezien worden dat de combinatietherapie met 15 nM cetuximab een grotere inhiberende functie heeft op de celgroei. Zowel bij mono- als bij combinatietherapie wordt het grootste effect waargenomen bij de hoogste concentratie van GM

6001 (50 μM). Toch is het effect van de inhibitor vrij beperkt. De cetuximab-controle vertoont een verminderde proliferatie vanaf 50u na de behandeling. Deze daling kan het gevolg zijn van een toegenomen activiteit van de gebruikte cetuximab-oplossing. De DMSO-controle toont aan dat DMSO geen effect heeft op de celgroei. Deze resultaten zijn echter niet samenhangend genoeg om een besluit te kunnen vormen. Daarom dient dit experiment herhaald te worden.

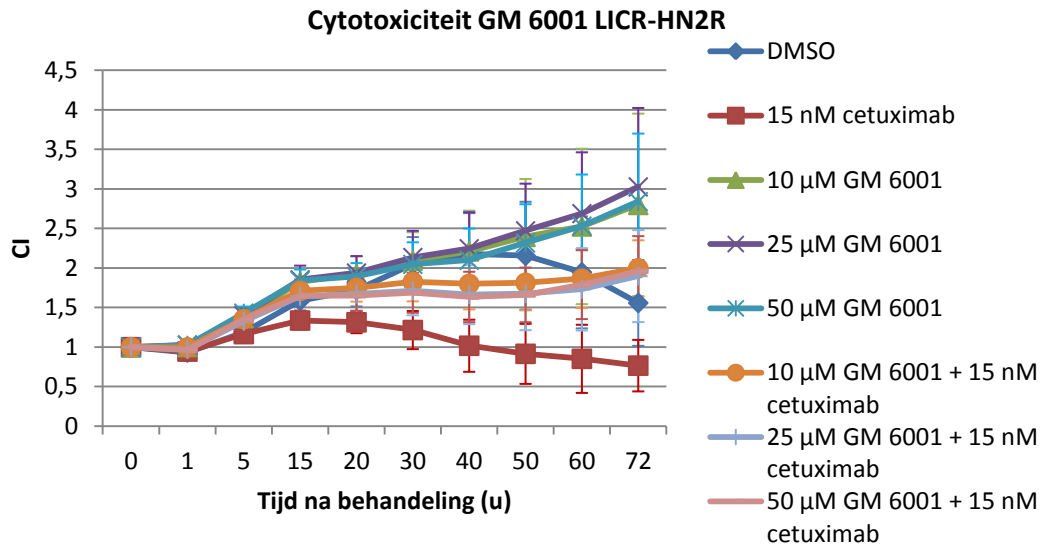


Figuur 25: Cytotoxiciteit van GM 6001 bij SC263R in mono- en in combinatietherapie met cetuximab.

Wanneer GM 6001 in combinatie met 15 nM cetuximab toegediend wordt, is een groter inhiberend effect op de celgroei waar te nemen dan in monotherapie. Zowel bij mono- als bij combinatietherapie wordt het grootste effect gezien bij de hoogste concentratie van GM 6001 (50 μM). Door een verhoogde activiteit van de gebruikte cetuximab-oplossing is er een daling van de cetuximab-controle waar te nemen.

4.3.2.2. LICR-HN2R

De cytotoxiciteit van GM 6001 in mono- en combinatietherapie met 15 nM cetuximab voor LICR-HN2R wordt weergegeven in Figuur 26. Deze grafiek toont aan dat het effect van GM 6001 vrij beperkt is. In combinatie met 15 nM cetuximab wordt het grootste effect waargenomen. Tussen de verschillende concentraties GM 6001 wordt weinig verschil in cytotoxiciteit waargenomen. De cetuximab-controle heeft een zeer lage waarde wat mogelijk het gevolg kan zijn van een verhoogde activiteit van de gebruikte cetuximab-oplossing. Bovendien wordt ook een daling van de DMSO controle waargenomen. Aangezien de resultaten van deze test niet heel samenhangend zijn en de controles afwijkend zijn, dient dit experiment herhaald te worden.



Figuur 26: Cytotoxiciteit van GM 6001 bij LICR-HN2R in mono- en combinatietherapie met cetuximab.

Het effect van GM 6001 is beperkt bij LICR-HN2R. In combinatie met cetuximab wordt de grootste cytotoxiciteit bereikt. De cetuximab-controle heeft een lage waarde wat mogelijk het gevolg is van een verhoogde activiteit van de gebruikte cetuximab-oplossing. De DMSO controle vertoont ook een afname in proliferatie.

Discussie

In meer dan 90% van de HNSCC komt EGFR verhoogd tot expressie waardoor deze receptor uitermate geschikt is voor doelgerichte therapie. Cetuximab, een monoklonaal antilichaam tegen het extracellulair domein van EGFR, is het enige anti-EGFR therapeuticum dat een FDA en EMEA goedkeuring heeft voor klinisch gebruik voor HNSCC. Toch zijn de klinische resultaten vrij beperkt aangezien er een verlenging van overleving met slechts 2,7 maanden gezien wordt. Bovendien is er maar een reductie van 20% van de relatieve kans op overlijden (Vermorken et al., 2008). Deze teleurstellende klinische resultaten duiden op het optreden van resistentie tegen cetuximab. Aangezien cetuximab het enige anti-EGFR therapeuticum is dat een toepassing kent in de kliniek, is het van belang om het onderliggende mechanisme van verworven resistentie tegen cetuximab te ontrafelen. Wanneer dit mechanisme gekend is, kan de huidige therapie geoptimaliseerd worden of kunnen er nieuwe doelwitten gevonden worden voor doelgerichte therapie. Bovendien kan dit onderzoek leiden tot de ontdekking van biomerkers die duiden op de ontwikkeling van resistentie tegen cetuximab waardoor bij deze patiënten een andere therapie gestart kan worden.

Voorgaande genexpressiestudies toonden aan dat het ligand HB-EGF, het cytokine IL-8 en het peptidase ADAM 19 verhoogd tot expressie kwamen in HNSCC cellijnen met verworven cetuximab-resistentie. Daarnaast vertoonde het genexpressieprofiel ook kenmerken van EMT. Hierdoor kan enerzijds gesteld worden dat verworven resistentie het gevolg kan zijn van een toegenomen activiteit van HB-EGF, IL-8 en ADAM 19. Anderzijds duiden kenmerken van EMT op een hogere migratoire capaciteit, waardoor cetuximab-resistente cellijnen meer migratoir zijn dan cetuximab-gevoelige cellijnen.

Verhoogde HB-EGF-expressie kan leiden tot een constitutieve activatie van EGFR door binding aan EGFR en HER4 (Holbro et al., 2003). In de literatuur is verder beschreven dat verhoogde expressie van EGFR liganden, kan resulteren in de ontwikkeling van resistentie tegen EGFR doelgerichte therapie (Brand et al., 2011). Tenslotte blijkt dat verhoogde expressie van EGFR liganden de internalisatie van EGFR stimuleert. Hierdoor ontstaat er meer nucleair EGFR (Li et al., 2009). Bovendien gaat dit nucleair EGFR een effect uitoefenen op de celcyclusgenen waardoor de resistentie in stand wordt gehouden (Li et al., 2009). De verhoogde expressie van HB-EGF in resistente HNSCC cellijnen werd ook door een andere onderzoeksgroep aangetoond (Hatakeyama et al., 2010), net als een verhoogde expressie van andere EGFR liganden zoals AREG, TGF- α , EGF en BTC (Hatakeyama et al., 2010; O-Charoenrat et al., 2000). Bovendien werd deze verhoogde expressie ook aangetoond bij patiënten. Zo werd bij patiënten met eierstokkanker een significant hogere concentratie sHB-EGF aangetoond in het serum, vergeleken met gezonde vrijwilligers (Kasai et al., 2012). Om de functie van HB-EGF in cetuximab-resistentie te onderzoeken, werd sHB-EGF geneutraliseerd met behulp van een antilichaam in combinatietherapie met cetuximab. Deze experimenten toonden aan dat neutralisatie van sHB-EGF geen effect heeft op de celoverleving van de cetuximab-resistente cellijnen, zowel in mono- als in combinatietherapie. Een mogelijke verklaring hiervoor kan gevonden worden in de eigenschappen van het antilichaam. Dit bindt en neutraliseert namelijk enkel het vrij sHB-EGF, terwijl activatie van pro-HB-EGF door ADAM resulteert in de klieving van pro-HB-EGF in sHB-EGF en een cytoplasmatisch deel HB-EGF-CTF (Hatakeyama et al., 2010; Nanba et al., 2003). HB-EGF-CTF ondergaat een translocatie naar de nucleus, waar het bindt met PLZF eiwitten en Bcl6 (Hatakeyama et al., 2010; Nanba et al., 2003; Shimura et al., 2012). Hierdoor wordt de expressie van cycline A en cycline D2 niet onderdrukt en zal de celcyclus voortgezet worden (Hatakeyama et al., 2010; Shimura et al., 2012). Om de klieving van pro-HB-EGF in sHB-EGF en HB-EGF-CTF door ADAM te voorkomen, werden cytotoxiciteitsexperimenten met GM 6001, een ADAM inhibitor, uitgevoerd. In verschillende studies werd aangetoond dat ADAM betrokken is bij tumorprogressie, fosforylatie van EGFR, expressie van TGF- α en apoptose (Kyula et al., 2010; McGowan et al., 2013; Xu et al., 2010). Bovendien kan ADAM 8 en 19 gecorreleerd worden met een hogere invasiviteit (Wildeboer et al., 2006). Hierdoor kan ADAM mogelijk een rol spelen bij het optreden van EMT en daardoor ook resistentie tegen cetuximab. De uitgevoerde experimenten in

deze thesis moeten nog herhaald worden aangezien er geen consistente resultaten bekomen werden. Toch duiden deze eerste resultaten op een vrij beperkte toename van de cytotoxiciteit van cetuximab bij toediening van GM 6001. Bij SC263R is er een groter effect van GM 6001 waar te nemen in vergelijking met LICR-HN2R. Dit verschil kan verklaard worden door een hogere expressie van ADAM 19 bij SC263R, waardoor in deze cellijn ADAM 19 een grotere rol speelt bij de activatie van HB-EGF. De lage activiteit van GM 6001 kan mogelijks verklaard worden door de translocatie van pro-HB-EGF naar de nucleus na stimulatie met *shedding* stimuli (Hieda et al., 2008).

Haddad et al. toonde aan dat HNSCC cellijnen die resistent zijn aan erlotinib veel mesenchymale eigenschappen en weinig E-cadherine bezitten (Haddad et al., 2009). Mesenchymale eigenschappen werden ook geassocieerd met minder activatie van de MAPK en PI3K signaalweg door EGFR signalisatie (Basu et al., 2010). Bovendien werd in HNSCC een verhoogde expressie van cortactine aangetoond, wat resulteert in verhoogde expressie van AKT waardoor de celcyclus gestimuleerd wordt en apoptose geïnhibieerd wordt (Brand et al., 2011; Rogers et al., 2005; Timpson et al., 2007). Deze verhoogde expressie van AKT wordt ook waargenomen in mesenchymale celpopulaties die resistent zijn aan EGFR doelgerichte therapie (Fuchs et al., 2008). Hierdoor zijn celpopulaties die mesenchymale eigenschappen verworven hebben mogelijks betrokken bij de ontwikkeling van resistentie tegen EGFR doelgerichte therapie. Daarnaast is ook bekend dat E-cadherine een EGFR-activerend eiwit is, aangezien het EGFR kan activeren op een ligand-onafhankelijke manier, door de vorming van moleculaire complexen (Kalyankrishna en Grandis, 2006; Pece en Gutkind, 2000). Onderzoek toonde aan dat afname van E-cadherine expressie resulteert in een verminderde respons op cetuximab in urotheliale carcinomacellen (Black et al., 2008). Hierdoor kan aangenomen worden dat EMT resistentie tegen cetuximab in de hand werkt. Om deze reden werd de migratoire capaciteit van cetuximab-gevoelige en cetuximab-resistente cellijnen met elkaar vergeleken. Deze experimenten toonden aan dat LICR-HN2R en LICR-HN2S niet migratoir zijn. Deze resultaten zijn in overeenstemming met eerder uitgevoerde genexpressiestudies waaruit bleek dat de resistente cellijn geen vimentine noch HB-EGF, IL-8 en ADAM 19 tot expressie brengt. Dit in tegenstelling tot beide andere resistente cellijnen (SC263R en LICR-HN5R). Bovendien bleek dat de LICR-HN2R cellijn geen 100% resistentieprofiel kon bereiken voor cetuximab. Hierdoor komt de in de literatuur beschreven hogere migratoire capaciteit voor resistente cellijnen minder tot uiting. SC263R en SC263S blijken wel migratoir te zijn, maar er wordt geen statistisch significant hogere migratie gezien bij de resistente cellijn ($p=0,337$). LICR-HN5R blijkt wel significant meer te migreren dan LICR-HN5S ($p=0,004$). De qRT-PCR toont een hogere expressie van vimentine in de resistente cellijn. Om een mogelijk effect van het serum op de migratoire capaciteit uit te sluiten, werden de migratietesten uitgevoerd in een serumvrije en een serumbevattende conditie. Voor de drie cellijnen (SC263, LICR-HN2 en LICR-HN5) werd geen effect van het serum op de migratoire capaciteit waargenomen.

Hatakeyama et al. toonden aan dat HB-EGF EMT kan induceren door opregulatie van FGFR (Hatakeyama et al., 2010). Dit resulteert in een verminderde expressie van E-cadherine (Smith et al., 2009). Daarnaast toonde onderzoek aan dat nucleaire translocatie van HB-EGF-CTF invasie veroorzaakt bij maagkanker (Shimura et al., 2012). Dit suggereert dat HB-EGF betrokken is bij EMT in HNSCC en zo eventueel ook de ontwikkeling van resistentie tegen cetuximab. Dit kan ook geconcludeerd worden bij de observaties van de migratietesten uitgevoerd in deze thesis. Maar naast HB-EGF kunnen ook de onderliggende signaalwegen van EGFR bijdragen aan het optreden van EMT en de ontwikkeling van resistentie tegen cetuximab. Zo wordt in HNSCC de AKT signaalweg opgereguleerd bij EMT door de dalende EGFR concentratie die dan optreedt (Maseki et al., 2012). Hierdoor kan EMT bijdragen tot het in stand houden van de resistentie tegen EGFR doelgerichte therapie. Bovendien is de AKT signaalweg ook opgereguleerd bij HNSCC die resistent zijn aan gefitinib (Maseki et al., 2012). Naast de AKT signaalweg is ook de ERK signaalweg geactiveerd bij de ontwikkeling van resistentie tegen EGFR inhibitoren (Ercan et al., 2012). Zo zorgt LIV-1, een zink transporter, enerzijds voor het optreden van EMT en anderzijds voor een verhoogde expressie van HB-EGF en MMP in prostaatkankercellen. Door deze hoge concentraties MMP wordt HB-EGF

gekliefd, waardoor de ERK signaalweg constitutief geactiveerd wordt (Lue et al., 2011). Door de betrokkenheid van de onderliggende signaalwegen bij de ontwikkeling van resistentie tegen EGFR doelgerichte therapie zijn deze signaalwegen een interessant doelwit om nieuwe doelgerichte therapeutica te ontwikkelen die de verworven resistentie tegen cetuximab kunnen omzeilen.

Conclusie

Deze thesis had tot doel om na te gaan of de ligand HB-EGF, het cytokine IL-8 en het peptidase ADAM 19 betrokken zijn bij de ontwikkeling van verworven resistentie tegen cetuximab. Deze hypothese werd gesteld nadat een eerdere genexpressie studie een verhoogde expressie van HB-EGF, IL-8 en ADAM 19 had aangetoond in cetuximab-resistente cellijnen.

Uit de experimenten blijkt dat sHB-EGF niet betrokken is bij de ontwikkeling van resistentie tegen cetuximab. Aangezien sHB-EGF gevormd wordt na ectodomein shedding van pro-HB-EGF, wat tevens resulteert in de vorming van HB-EGF-CTF, kan de rol van HB-EGF in de ontwikkeling van resistentie niet volledig uitgesloten worden. Deze mogelijke rol moet nog verder onderzocht worden door HB-EGF-CTF en pro-HB-EGF te blokkeren.

De migratoire capaciteit van cetuximab-resistente cellijnen blijkt hoger te zijn dan deze van cetuximab-gevoelige cellijnen. Hierdoor draagt EMT mogelijk bij tot de ontwikkeling van resistentie. Om hierover meer gegevens te hebben, kan de invasiviteit van cetuximab-resistente cellijnen vergeleken worden met deze van cetuximab-gevoelige cellijnen. Bovendien kan de rol van HB-EGF in EMT onderzocht worden door de ligand te blokkeren en vervolgens de migratoire capaciteit te bestuderen.

Hoewel preliminaire resultaten aangaven dat een lichte verbetering in gevoeligheid voor cetuximab optrad in resistente cellijnen, moeten de experimenten met GM 6001, een ADAM inhibitor, herhaald worden om een duidelijk besluit te kunnen vormen over de betrokkenheid van ADAM 19 in de ontwikkeling van resistentie.

Dankwoord

Vijf leuke universitaire jaren dienen afgesloten te worden met een mooie masterproef. Deze komt er echter niet vanzelf en daarom zou ik graag nog enkele mensen willen bedanken.

In de eerste plaats gaat mijn dank uit naar prof. dr. Filip Lardon om mij de kans te geven mijn masterproef binnen zijn onderzoeksgroep uit te voeren en me wat te verdiepen in kankeronderzoek, wat me altijd geboeid heeft.

Carolien, hartelijk dank om mij zo goed te begeleiden de afgelopen 6 maanden. Dankzij jou kwam ik elke dag met veel zin werken aangezien je me telkens kon motiveren, ook al was er eens een tegenvallend of mislukt experiment. Jouw enthousiasme werkt aanstekelijk. Bovendien heb je me goed opgeleid in het labo. Alle labervaring die ik nu heb, heb ik eigenlijk te danken aan jou. Je tips voor het maken van een poster en voor het schrijven van een thesis kunnen me zeker nog helpen in de toekomst. Ook voor al de tijd die je gestoken hebt in het nalezen en verbeteren van mijn thesis wil ik je bedanken.

Marc Baay, mijn co-promotor, wil ik bedanken voor het nalezen van mijn thesis en zijn kritische reflectie hierop.

Ook Céline, Jolien, Greet, Hilde, Johan, Ridha, Vanessa, Nele en Julie wil ik bedanken voor de fijne gesprekken tijdens de middag en in het labo en voor de hulp, raad en tips die ik mocht ontvangen van hen.

Stephanie, zo een half jaar samen een bureau delen heb ik me zeker niet beklagd. Na een mislukt of tegenvallend experiment konden we altijd ons hart luchten bij elkaar en als we wat technische problemen hadden tijdens het schrijven van onze thesis, konden we steeds raad bij elkaar vragen.

Maar vijf jaren universiteit waren niet mogelijk geweest zonder mijn ouders. Mama en papa, jullie wil ik bedanken om mij de kans te geven om verder te studeren. Jullie zijn altijd in mij blijven geloven en jullie motiverende woorden hebben mij zeker geholpen de vijf afgelopen jaren succesvol af te ronden. Mama, jou wil ik bedanken om tijdens de examenperiodes mij lichtjes te verwennen zodat deze periodes toch wat draaglijker werden. Papa, ook al ben je hier nu niet meer, ik ben ervan overtuigd dat je mij nog steeds goed in de gaten houdt en mij blijft steunen in alles wat ik doe, daar waar je bent. Ik vind het jammer dat je me niet kan zien afstuderen maar ik hoop dat je er toch op één of andere manier bij kan zijn en fier kan zijn op mij.

Ook mijn broer, Dries, wil ik bedanken aangezien hij elke examenperiode opnieuw rekening met mij moest houden. Mijn grootouders wil ik bedanken om elke examenperiode te geloven in mij en te duimen voor een goed resultaat.

Tenslotte wil ik ook nog mijn vriend Tom bedanken. Jouw steun tijdens de afgelopen twee jaar was van onschatbare waarde. Door alle moeilijke momenten heb je me geholpen en steeds stond je voor mij klaar. Je was een luisterend oor voor mijn problemen en kon me motiveren om verder te blijven gaan.

Met een goed gevoel ga ik nu op mijn eigen benen staan.

Dank je wel,

Lina

Referenties

Abassi, Y.A., Xi, B., Zhang, W.F., Ye, P.F., Kirstein, S.L., Gaylord, M.R., Feinstein, S.C., Wang, X.B., en Xu, X. (2009). Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chem Biol* 16, 712-723.

Anderson, J.A., Irish, J.C., McLachlin, C.M., en Ngan, B.Y. (1994). H-RAS oncogene mutation and human papillomavirus infection in oral carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 120, 755-760.

Argiris, A., Karamouzis, M.V., Raben, D., en Ferris, R.L. (2008). Head and neck cancer. *Lancet* 371, 1695-1709.

Astsaturov, I., Cohen, R.B., en Harari, P. (2006). Targeting epidermal growth factor receptor signaling in the treatment of head and neck cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 6, 1179-1193.

Atienza, J.M., Yu, N.C., Kirstein, S.L., Xi, B., Wang, X.B., Xu, X., en Abassi, Y.A. (2006). Dynamic and label-free cell-based assays using the real-time cell electronic sensing system. *Assay Drug Dev Technol* 4, 597-607.

Barrallo-Gimeno, A., en Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151-3161.

Basu, D., Nguyen, T.T.K., Montone, K.T., Zhang, G., Wang, L.P., Diehl, J.A., Rustgi, A.K., Lee, J.T., Weinstein, G.S., en Herlyn, M. (2010). Evidence for mesenchymal-like sub-populations within squamous cell carcinomas possessing chemoresistance and phenotypic plasticity. *Oncogene* 29, 4170-4182.

Begg, A.C., Sprong, D., Balm, A., en Martin, J.M.C. (2002). Premature chromosome condensation and cell separation studies in biopsies from head and neck tumors for radio sensitivity prediction. *Radiother Oncol* 62, 335-343.

Belgian Cancer Registry (2011a). Cancer Incidence and mortality: Cancer of all sites. In *Cancer Incidence in Belgium, 2008* (Brussel), pp. 23-29.

Belgian Cancer Registry (2011b). Cancer Incidence and mortality: Head and neck. In *Cancer Incidence in Belgium, 2008* (Brussel), pp. 30-35.

Belgian Federal Government (2012). Bevolking - Doodsoorzaken 1998, 1999, 2004, 2005, 2006, 2008 en 2009. <<http://statbel.fgov.be/nl/modules/publications/statistiques/bevolking/Doodsoorzaken.jsp>> Accessed 30/01/2013.

Benavente, S., Huang, S., Armstrong, E.A., Chi, A., Hsu, K.T., Wheeler, D.L., en Harari, P.M. (2009). Establishment and characterization of a model of acquired resistance to epidermal growth factor receptor targeting agents in human cancer cells. *Clin Cancer Res* 15, 1585-1592.

Bishayee, S. (2000). Role of conformational alteration in the epidermal growth factor receptor (EGFR) function. *Biochem Pharmacol* 60, 1217-1223.

Black, P.C., Brown, G.A., Inamoto, T., Shrader, M., Arora, A., Siefker-Radtke, A.O., Adam, L., Theodorescu, D., Wu, X., Munsell, M.F., *et al.* (2008). Sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitor requires E-cadherin expression in urothelial carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 14, 1478-1486.

- Blobel, C.P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 32-43.
- Bonner, J.A., Harari, P.M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D.M., Cohen, R.B., Jones, C.U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., *et al.* (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354, 567-578.
- Boyden, S. (1962). Chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115, 453-465.
- Bracke, M., De Wever, O., en Vakaet, L. (2011). Invasie en metastasering. In *Kanker biomedisch bekeken*, M. Bracke, F. Lardon, P. Vandenberghe, en K. Vanderkerken, eds. (Antwerpen, Standaard Uitgeverij / WPG Uitgevers België), pp. 206-232.
- Brand, T.M., Iida, M., en Wheeler, D.L. (2011). Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* 11, 777-792.
- Burke, P., Schooler, K., en Wiley, H.S. (2001). Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol Biol Cell* 12, 1897-1910.
- Camp, E.R., Summy, J., Bauer, T.W., Liu, W.B., Gallick, G.E., en Ellis, L.M. (2005). Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 11, 397-405.
- Cantley, L. (2009). Signal Transduction. In *Medical physiology*, W. Boron, en E. Boulpaep, eds. (Saunders Elsevier), pp. 7-47.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.
- Carmeliet, P., en Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Chang, S.S., en Califano, J. (2008). Current status of biomarkers in head and neck cancer. *J Surg Oncol* 97, 640-643.
- Chen, L.F., Cohen, E.E., en Grandis, J.R. (2010). New strategies in head and neck cancer: understanding resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clin Cancer Res* 16, 2489-2495.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., en Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073-1081.
- Easty, D.M., Easty, G.C., Carter, R.L., Monaghan, P., en Butler, L.J. (1981). 10 human carcinoma cell lines derived from squamous carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 43, 772-785.
- Ercan, D., Xu, C., Yanagita, M., Monast, C.S., Pratilas, C.A., Montero, J., Butaney, M., Shimamura, T., Sholl, L., Ivanova, E.V., *et al.* (2012). Reactivation of ERK signaling causes resistance to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov* 2, 934-947.
- European Medicines Agency (2013). Erbitux. <http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000558/human_med_000769.jsp> Accessed 9/04/2013.

- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6, 273-286.
- Fuchs, B.C., Fujii, T., Dorfman, J.D., Goodwin, J.M., Zhu, A.X., Lanuti, M., en Tanabe, K.K. (2008). Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 68, 2391-2399.
- Galffy, G., Mohammed, K.A., Dowling, P.A., Nasreen, N., Ward, M.J., en Antony, V.B. (1999). Interleukin 8: An autocrine growth factor for malignant mesothelioma. *Cancer Res* 59, 367-371.
- Grandis, J.R., en Sok, J.C. (2004). Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther* 102, 37-46.
- Haddad, Y., Choi, W., en McConkey, D.J. (2009). Delta-Crystallin Enhancer Binding Factor 1 Controls the Epithelial to Mesenchymal Transition Phenotype and Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Erlotinib in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Lines. *Clin Cancer Res* 15, 532-542.
- Hama, T., Yuza, Y., Saito, Y., J, O.u., Kondo, S., Okabe, M., Yamada, H., Kato, T., Moriyama, H., Kurihara, S., *et al.* (2009). Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncologist* 14, 900-908.
- Hanahan, D., en Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hatakeyama, H., Cheng, H., Wirth, P., Counsell, A., Marcrom, S.R., Wood, C.B., Pohlmann, P.R., Gilbert, J., Murphy, B., Yarbrough, W.G., *et al.* (2010). Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* 5, e12702.
- Hieda, M., Isokane, M., Koizumi, M., Higashi, C., Tachibana, T., Shudou, M., Taguchi, T., Hieda, Y., en Higashiyama, S. (2008). Membrane-anchored growth factor, HB-EGF, on the cell surface targeted to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol* 180, 763-769.
- Higashiyama, S., Iwabuki, H., Morimoto, C., Hieda, M., Inoue, H., en Matsushita, N. (2008). Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci* 99, 214-220.
- Ho, M., Davis, S.L., Ames, S.J., en Spanjaard, R.A. (2002). Amplification of wild-type K-RAS promotes growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 62, 7154-7156.
- Holbro, T., Civenni, G., en Hynes, N.E. (2003). The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284, 99-110.
- Huang, S.M., Bock, J.M., en Harari, P.M. (1999). Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 59, 1935-1940.
- Igarashi, P. (2009). Regulation of gene expression. In *Medical physiology*, W. Boron, en E. Boulpaep, eds. (Saunders Elsevier), pp. 75-105.
- Itoh, Y., Joh, T., Tanida, S., Sasaki, M., Kataoka, H., Itoh, K., Oshima, T., Ogasawara, N., Togawa, S., Wada, T., *et al.* (2005). IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine* 29, 275-282.

Iwamoto, R., en Mekada, E. (2006). ErbB and HB-EGF signaling in heart development and function. *Cell Struct Funct* 31, 1-14.

Jijon, H.B., Buret, A., Hirota, C.L., Hollenberg, M.D., en Beck, P.L. (2012). The EGF receptor and HER2 participate in TNF-alpha-dependent MAPK activation and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. *Mediators Inflamm* 2012, 207398.

Joseph, A.W., en D'Souza, G. (2012). Epidemiology of human papillomavirus-related head and neck cancer. *Otolaryngol Clin N Am* 45, 739-764.

Kalluri, R. (2009). EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 119, 1417-1419.

Kalyankrishna, S., en Grandis, J.R. (2006). Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 24, 2666-2672.

Kang, Y.B., en Massague, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. *Cell* 118, 277-279.

Kasai, N., Kobayashi, K., Shioya, S., Yoshikawa, Y., Yotsumoto, F., Miyamoto, S., Mekada, E., en Enokizono, J. (2012). Soluble heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) detected by newly developed immuno-PCR method is a clear-cut serological biomarker for ovarian cancer. *Am J Transl Res* 4, 415-421.

Kyula, J.N., Van Schaeybroeck, S., Doherty, J., Fenning, C.S., Longley, D.B., en Johnston, P.G. (2010). Chemotherapy-Induced Activation of ADAM-17: A Novel Mechanism of Drug Resistance in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 16, 3378-3389.

Langer, C.J. (2008). Targeted therapy in head and neck cancer - State of the art 2007 and review of clinical applications. *Cancer* 112, 2635-2645.

Lardon, F., De Wever, I., Meijnders, P., Vermorken, J., van Rijswijk, R., Pauwels, B., en Wouters, A. (2011). Principes van conventionele kankertherapieën. In *Kanker biomedisch bekeken*, M. Bracke, F. Lardon, P. Vandenberghe, en K. Vanderkerken, eds. (Antwerpen, Standaard Uitgeverij/ WPG Uitgevers België nv), pp. 314-345.

Le Quement, C., Guenon, I., Gillon, J.Y., Lagente, V., en Boichot, E. (2008). MMP-12 induces IL-8/CXCL8 secretion through EGFR and ERK1/2 activation in epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L1076-1084.

Li, C., Iida, M., Dunn, E.F., Ghia, A.J., en Wheeler, D.L. (2009). Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 28, 3801-3813.

Licitra, L., en Felip, E. (2009). Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 20, iv121-iv122.

Life Technologies (2013). TrypLE Express. <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/12605010>> Accessed 13/03/2013.

Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Fransen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O., en Pauwels, P. (2012). Comparative Analysis of Dynamic Cell Viability, Migration and Invasion Assessments by Novel Real-Time Technology and Classic Endpoint Assays. *PLoS One* 7, 1-12.

- Lo, H.-W., Ali-Seyed, M., Wu, Y., Bartholomeusz, G., Hsu, S.-C., en Hung, M.-C. (2006). Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin β 1 and CRM1. *Journal of Cellular Biochemistry* 98, 1570-1583.
- Lue, H.W., Yang, X.J., Wang, R.X., Qian, W.P., Xu, R.Z.H., Lyles, R., Osunkoya, A.O., Zhou, B.H.P., Vessella, R.L., Zayzafoon, M., *et al.* (2011). LIV-1 Promotes Prostate Cancer Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis through HB-EGF Shedding and EGFR-Mediated ERK Signaling. *PLoS One* 6, 13.
- Luppi, F., Longo, A.M., de Boer, W.I., Rabe, K.F., en Hiemstra, P.S. (2007). Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer* 56, 25-33.
- Mandic, R., Ludwig, T., Oberleithner, H., en Werner, J.A. (2004). Evaluation of head and neck squamous cell carcinoma invasiveness by the electrical resistance breakdown assay. *Clin Exp Metastasis* 21, 699-704.
- Maseki, S., Ijichi, K., Tanaka, H., Fujii, M., Hasegawa, Y., Ogawa, T., Murakami, S., Kondo, E., en Nakanishi, H. (2012). Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3 β /snail signalling pathway. *Br J Cancer* 106, 1196-1204.
- McGowan, P.M., Mullooly, M., Caiazza, F., Sukor, S., Madden, S.F., Maguire, A.A., Pierce, A., McDermott, E.W., Crown, J., O'Donovan, N., *et al.* (2013). ADAM-17: a novel therapeutic target for triple negative breast cancer. *Annals of Oncology* 24, 362-369.
- Milas, L., Mason, K., Hunter, N., Petersen, S., Yamakawa, M., Ang, K., Mendelsohn, J., en Fan, Z. (2000). In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 6, 701-708.
- Moon, C., Chae, Y.K., en Lee, J. (2010). Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab. *Exp Biol Med* 235, 907-920.
- Morgillo, F., Bareschino, M.A., Bianco, R., Tortora, G., en Ciardiello, F. (2007). Primary and acquired resistance to anti-EGFR targeted drugs in cancer therapy. *Differentiation* 75, 788-799.
- Murugan, A.K., Munirajan, A.K., en Tsuchida, N. (2012). Ras oncogenes in oral cancer: The past 20 years. *Oral Oncol* 48, 383-392.
- Nanba, D., Mammoto, A., Hashimoto, K., en Higashiyama, S. (2003). Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. *J Cell Biol* 163, 489-502.
- National Cancer Institute (2012). Head and neck cancers. <<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/head-and-neck>> Accessed 15/02/2013.
- Nyati, M.K., Morgan, M.A., Feng, F.Y., en Lawrence, T.S. (2006). Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 6, 876-885.
- O'Rorke, M.A., Ellison, M.V., Murray, L.J., Moran, M., James, J., en Anderson, L.A. (2012). Human papillomavirus related head and neck cancer survival: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 48, 1191-1201.

- O-Charoenrat, P., Rhys-Evans, P., en Eccles, S. (2000). Expression and regulation of c-ERBB ligands in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 88, 759-765.
- Paliga, A., Onerheim, R., Gologan, A., Chong, G., Spatz, A., Niazi, T., Garant, A., Macheto, D., Alcindor, T., en Vuong, T. (2012). EGFR and K-ras gene mutation status in squamous cell anal carcinoma: a role for concurrent radiation and EGFR inhibitors? *Br J Cancer* 107, 1864-1868.
- Pauwels, B., Vandenberghe, P., Van Maerken, T., Lardon, F., en Vanderkerken, K. (2011). Kankerceldood en p53. In *Kanker biomedisch bekeken*, M. Bracke, F. Lardon, P. Vandenberghe, en K. Vanderkerken, eds. (Antwerpen, Standaard Uitgeverij / WPG Uitgevers België), pp. 152-167.
- Pavia, M., Pileggi, C., Nobile, C.G.A., en Angelillo, I.F. (2006). Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* 83, 1126-1134.
- Pece, S., en Gutkind, J.S. (2000). Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem* 275, 41227-41233.
- Perez-Ordóñez, B., Beauchemin, M., en Jordan, R.C.K. (2006). Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 59, 445-453.
- Psyrri, A., Gouveris, P., en Vermorken, J. (2009). Human papillomavirus-related head and neck tumors: clinical and research implication. *Current Opinion in Oncology* 21, 201-205.
- Radisky, D.C. (2005). Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 118, 4325-4326.
- Ratushny, V., Astsaturov, I., Burtness, B.A., Golemis, E.A., en Silverman, J.S. (2009). Targeting EGFR resistance networks in head and neck cancer. *Cell Signal* 21, 1255-1268.
- Rocco, J.W., en Sidransky, D. (2001). p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 264, 42-55.
- Rogers, S.J., Harrington, K.J., Rhys-Evans, P., Charoenrat, P.O., en Eccles, S.A. (2005). Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 24, 47-69.
- Seals, D.F., en Courtneidge, S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & Development* 17, 7-30.
- Shimura, T., Yoshida, M., Fukuda, S., Ebi, M., Hirata, Y., Mizoshita, T., Tanida, S., Kataoka, H., Kamiya, T., Higashiyama, S., *et al.* (2012). Nuclear translocation of the cytoplasmic domain of HB-EGF induces gastric cancer invasion. *BMC Cancer* 12, 1-10.
- Singh, R.K., en Lokeshwar, B.L. (2011). The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth. *Cancer Res* 71, 3268-3277.
- Smith, A., Teknos, T.N., en Pan, Q.T. (2013). Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 49, 287-292.
- Smith, J.P., Pozzi, A., Dhawan, P., Singh, A.B., en Harris, R.C. (2009). Soluble HB-EGF induces epithelial-to-mesenchymal transition in inner medullary collecting duct cells by upregulating Snail-2. *Am J Physiol-Renal Physiol* 296, F957-F965.

Sok, J.C., Coppelli, F.M., Thomas, S.M., Lango, M.N., Xi, S.C., Hunt, J.L., Freilino, M.L., Graner, M.W., Wikstrand, C.J., Bigner, D.D., *et al.* (2006). Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 12, 5064-5073.

Specenier, P., Van Tendeloo, V., Michiels, L., en Lardon, F. (2011). Doelgerichte kankertherapieën. In *Kanker biomedisch bekeken*, M. Bracke, F. Lardon, P. Vandenberghe, en K. Vanderkerken, eds. (Antwerpen, Standaard Uitgeverij/ WPG Uitgevers België nv), pp. 346-358.

Szabo, B., Nelhubel, G.A., Karpati, A., Kenessey, I., Jori, B., Szekely, C., Petak, I., Lotz, G., Hegedus, Z., Hegedus, B., *et al.* (2011). Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 47, 487-496.

Tanida, S., Kataoka, H., Mizoshita, T., Shimura, T., Kamiya, T., en Joh, T. (2010). Intranuclear translocation signaling of HB-EGF carboxy-terminal fragment and mucosal defense through cell proliferation and migration in digestive tracts. *Digestion* 82, 145-149.

Timpson, P., Wilson, A.S., Lehrbach, G.M., Sutherland, R.L., Musgrove, E.A., en Daly, R.J. (2007). Aberrant expression of cortactin in head and neck squamous cell carcinoma cells is associated with enhanced cell proliferation and resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib. *Cancer Res* 67, 9304-9314.

Vanderkerken, K., De Raeve, H., en Vandenberghe, P. (2011). Wat is kanker? In *Kanker biomedisch bekeken*, M. Bracke, F. Lardon, P. Vandenberghe, en K. Vanderkerken, eds. (Antwerpen, Standaard Uitgeverij/ WPG Uitgevers België), pp. 42-47.

Vermorken, J.B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kaweckki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H.R., Cupissol, D., *et al.* (2008). Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359, 1116-1127.

Vermorken, J.B., en Specenier, P. (2010). Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Annals of Oncology* 21, vii252-vii261.

Viloria-Petit, A., Crombet, T., Jothy, S., Hicklin, D., Bohlen, P., Schlaeppli, J.M., Rak, J., en Kerbel, R.S. (2001). Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: A role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res* 61, 5090-5101.

Vlaamse Liga tegen Kanker (2011). Hoofd- en halskanker. <<http://www.tegenkanker.be/hoofd-halskankers>> Accessed 15/02/2013.

Walden, M.J., en Aygun, N. (2013). Head and neck cancer. *Semin Roentgenology* 48, 75-86.

Wang, Y.N., en Hung, M.C. (2012). Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci* 2, 10.

Werner, J.A., Dunne, A.A., en Myers, J.N. (2003). Functional anatomy of the lymphatic drainage system of the upper aerodigestive tract and its role in metastasis of squamous cell carcinoma. *Head Neck-J Sci Spec Head Neck* 25, 322-332.

Werner, J.A., Rathcke, I.O., en Mandic, R. (2002). The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Exp Metastasis* 19, 275-282.

Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (2008). Gezondheidsenquête België 2008: Het gebruik van tabak. pp 234.

Wheeler, D.L., Huang, S., Kruser, T.J., Nechrebecki, M.M., Armstrong, E.A., Benavente, S., Gondi, V., Hsu, K.T., en Harari, P.M. (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* 27, 3944-3956.

Wheeler, S.E., Suzuki, S., Thomas, S.M., Sen, M., Leeman-Neill, R.J., Chiosea, S.I., Kuan, C.T., Bigner, D.D., Gooding, W.E., Lai, S.Y., *et al.* (2010). Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene* 29, 5135-5145.

Wildeboer, D., Naus, S., Sang, Q.X.A., Bartsch, J.W., en Pagenstecher, A. (2006). Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 516-527.

Xu, Q., Liu, X., Chen, W., en Zhang, Z. (2010). Inhibiting adenoid cystic carcinoma cells growth and metastasis by blocking the expression of ADAM 10 using RNA interference. *J Transl Med* 8, 1-10.

Zhang, Y., Wang, L., Zhang, M., Jin, M., Bai, C., en Wang, X. (2012). Potential mechanism of interleukin-8 production from lung cancer cells: an involvement of EGF-EGFR-PI3K-Akt-Erk pathway. *J Cell Physiol* 227, 35-43.

