

University of Groningen

**Trail receptor-targeted therapy : strategies to enhance DR4- and DR5-induced apoptosis**  
van Roosmalen, Ingrid

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2014

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

van Roosmalen, I. (2014). *Trail receptor-targeted therapy : strategies to enhance DR4- and DR5-induced apoptosis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

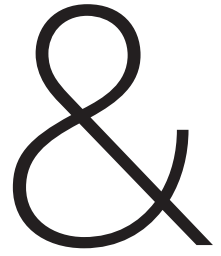
**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

APPENDIX

Nederlandse samenvatting  
Dankwoord





## NEDERLANDSE SAMENVATTING

### Inleiding

Kanker is één van de belangrijkste doodsoorzaken in de wereld en het aantal nieuwe gevallen en doden blijft toenemen [1]. Kanker is een verzamelnaam voor een groep ziekten die gekenmerkt wordt door het ongecontroleerd vermenigvuldigen van cellen waardoor gezond weefsel wordt aangetast. Een normale cel kan een kankercel worden doordat er mutaties optreden in genen die betrokken zijn bij verschillende belangrijke processen, zoals celdeling en apoptose waardoor het evenwicht tussen deze processen verloren gaat.

Apoptose is een nauw gereguleerd proces van celdood waarbij verouderde, ongezonde en overbodige cellen worden geëlimineerd. Het immuunsysteem is in staat om apoptotische cellen op te ruimen en derhalve komen er geen enzymen en afvalstoffen vrij die ontstekingsreacties kunnen veroorzaken. Apoptose is selectief en veroorzaakt daardoor, in tegenstelling tot necrose, geen schade aan omliggende cellen en weefsels. Het stimuleren van apoptose in tumorcellen wordt daarom gezien als een aantrekkelijke therapeutische benadering voor de behandeling van kanker. Er bestaan twee apoptose-signaleringsroutes: de extrinsieke (of *death receptor*) apoptoseroute, gereguleerd via de tumor necrose factor (TNF)-superfamilie van receptoren en liganden, en de intrinsieke apoptoseroute, waarbij de mitochondriën een centrale rol spelen.

Al decennialang bestaat de standaard behandelingsmethode van kanker uit chirurgische resectie al dan niet in combinatie met radio- en chemotherapie. Hoewel bestraling en chemotherapeutica er op gericht zijn om vooral apoptose te induceren via de intrinsieke apoptoseroute, zijn kankercellen vaak ongevoelig voor apoptose-inductie vanwege verlaagde expressie of activiteit van pro-apoptotische eiwitten en/of verhoogde expressie van anti-apoptotische eiwitten. Conventionele therapieën zijn bijvoorbeeld voor een deel afhankelijk van de activiteit van p53, een tumorsuppressor-eiwit dat genen betrokken bij apoptose en celdeling activeert [2, 3]. Vaak is het hiervoor coderende *TP53* gen gemuteerd in kankercellen. Hierdoor zijn conventionele therapieën vaak niet optimaal werkzaam en kunnen ze uiteindelijk leiden tot selectie van tumorresistente en de terugkeer van kanker. Bovendien zijn bestraling en chemotherapie vaak niet specifiek op kankercellen gericht. Dit houdt in dat ook gezonde, snelgroeiende cellen kunnen worden aangetast, zoals de cellen van het beenmerg, haarcellen en de slijmvliescellen van de darmen en de mond, waardoor ongewilde bijwerkingen optreden.

*TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) is een eiwit dat behoort tot de TNF superfamilie. Dit ligand is een veelbelovend antikankermiddel aangezien is aangetoond dat de recombinant humane vorm van TRAIL (rhTRAIL) zowel *in vitro* als *in vivo* selectief

apoptose induceert in verschillende soorten kankercellen ongeacht de p53-status [4, 5], en goed verdragen wordt door patiënten [6-8]. TRAIL kan aan vijf verschillende receptoren binden, waarvan *death receptor 4* (DR4, TRAIL-R1) en DR5 (TRAIL-R2) de extrinsieke apoptoseroute activeren. De andere drie TRAIL-receptoren, *decoy receptor 1* (DcR1), DcR2 en osteoprotegerin (OPG), kunnen daarentegen apoptose-inductie remmen door TRAIL weg te vangen [9, 10] of door niet-functionele heterotrimere complexen met DR4 of DR5 te vormen [11]. Ter verbetering van de antitumoractiviteit zijn agonistische DR-selectieve rhTRAIL-varianten [12-17] en monoclonale antilichamen (mAbs) gegenereerd om specifiek één DR te binden en gelijktijdig de DcR-binding te reduceren [18, 19]. Uit dit onderzoek is gebleken dat DR-selectieve agonisten sneller DRs binden en snellere en krachtigere initiatie van TRAIL-geïnduceerde apoptose bewerkstelligen [18, 19].

Hoewel preklinische en klinische studies hebben bewezen dat TRAIL een erg interessant antikankermiddel is [20, 21], wordt apoptose-inductie in ongeveer 50% van alle tumorcellen [22-24] belemmerd door moleculaire obstructies op verschillende niveaus in de apoptoseroute [25]. Het combineren van TRAIL-receptor-agonisten met andere therapeutica, waaronder chemotherapie, verbetert veelal apoptose-activatie in verschillende tumortypen, zoals glioblastoma multiforme (GBM) [26], colorectale kankers [27] en niet-kleincellige longkankers (NSCLC) [24]. Onderzoek naar strategieën die leiden tot verhoging van TRAIL-geïnduceerde apoptose met behoudt van tumorspecificiteit is essentieel om TRAIL-receptor-agonisten succesvol in te kunnen zetten bij de behandeling van kanker.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek is gericht op het ophelderen van de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de TRAIL-resistentie van verschillende soorten kankers. Op deze wijze kunnen rationele combinaties van rhTRAIL en andere middelen worden ontworpen met als doel de effectiviteit van TRAIL-geïnduceerde apoptose te verbeteren. Daarnaast waren we geïnteresseerd in de bijdrage van zowel DR4 als DR5 in apoptose-inductie en mogelijke tumorspecifieke voorkeur voor DR4- of DR5-geïnduceerde apoptose.

## SAMENVATTING VAN DIT PROEFSCHRIFT

In **hoofdstuk 1** wordt een korte, algemene introductie over kanker en TRAIL gegeven, gevolgd door een overzicht van de inhoud van dit proefschrift, waarna in **hoofdstuk 2** een overzicht wordt gegeven van de huidige kennis over de verschillen en overeenkomsten in functie en regulering van DR4 en DR5. In deze uitgebreide literatuurstudie hebben we de structuur en de aminozuursequenties van beide receptoren met elkaar vergeleken, een overzicht gegeven van de gevoeligheid van verschillende kankertypen voor DR-selectieve TRAIL-varianten en hebben we de mechanismen besproken die mogelijk kunnen verklaren waarom sommige kankers een voorkeur vertonen voor apoptose-

inductie via DR4 dan wel DR5. Studies waarin het effect van DR4- en DR5-selectieve agonisten *in vitro* is onderzocht laten zien dat de meeste leukemiecellen gevoelig zijn via activatie van DR4, terwijl de meeste andere tumoren heterogeniteit vertonen in receptor voorkeur. Verder concluderen we dat vooral DR4-expressie sterk gereguleerd wordt door posttranslationele modificaties en cellulaire transport processen en in mindere mate door promoter-methylering, terwijl DR5-expressie voornamelijk wordt gereguleerd op het transcriptionele niveau. Aangezien stress inductie voornamelijk via specifieke transcriptiefactoren werkt, zou dit kunnen verklaren waarom stress vooral DR5-gemedieerde apoptose induceert. Verder is aangetoond dat met name DR5 naast apoptose-inductie ook niet-apoptotische activiteit heeft, zoals stimuleren van proliferatie, migratie en invasie. Hoewel er nog veel onduidelijkheden zijn in de functionele verschillen tussen DR4 en DR5 is het evident dat er grote diversiteit in functie en regulatie is tussen DR4 en DR5 en dat dit mede afhankelijk is van de cellulaire context. Verder onderzoek is nodig om de onderliggende moleculaire verschillen die DR4 en DR5 functie bepalen op te helderen en kunnen leiden tot een betere inzet van receptor-specifieke agonisten in de kliniek.

In **hoofdstuk 3, 4 en 5** hebben we combinatietherapieën onderzocht die mogelijk een versterkend effect op TRAIL-geïnduceerde apoptose hebben. In **hoofdstuk 3** hebben we combinatiebehandeling met endoplasmatisch reticulum (ER)-stress-inducerend DMC gebruikt om apoptose-activatie door TRAIL te verbeteren in TRAIL-gevoelige A172 en TRAIL-resistente U87 glioblastoma multiforme (GBM) cellen. Het is aangetoond dat GBM cellen vaak in hoge mate resistent zijn tegen TRAIL-geïnduceerde apoptose vanwege verschillende factoren, waaronder matige tot lage expressie van DR4 en DR5 [28, 29] en de pro-apoptotische eiwitten caspase-8 en Bak [28, 30-32], en verhoogde expressie van anti-apoptotische eiwitten, zoals c-FLIP, Bcl-2 en survivin [28, 32-35]. Het is bekend dat stress van het ER, het celorganel dat onder andere betrokken is bij de synthese en het transport van eiwitten, deze modulaties tegenwerkt. Behandeling van cellen met DMC veroorzaakt een ER-stressreactie hetgeen uiteindelijk leidt tot verlaagde expressie van anti-apoptotische eiwitten en verhoogde expressie van pro-apoptotische eiwitten. Daarnaast is aangetoond dat DMC proliferatie blokkeert in verschillende tumor celkweekmodellen [36, 37] en antitumoractiviteit heeft *in vivo* [37]. In dit hoofdstuk hebben we door middel van de DR4-specifieke rhTRAIL-variant 4C7 en de DR5-specifieke rhTRAIL-variant D269H/E195R gevonden dat A172 cellen gevoelig waren voor activatie van DR5 en resistent voor TRAIL-geïnduceerde apoptose via DR4, terwijl U87 cellen resistent waren via beide DRs. Overexpressie van DR5 verhoogde niet de TRAIL-gevoeligheid van U87 cellen. We zagen dat DMC de proliferatie en levensvatbaarheid van cellen verminderde in een panel van GBM cellijnen. Hoewel activatie van ER-stress door DMC en de resulterende verlaging van survivin-expressie in zowel A172 en U87 cellen

is bevestigd, werd de TRAIL-gevoeligheid alleen verhoogd in de TRAIL-gevoelige A172 cellijn. Verlaging van survivin-expressie door middel van *small interfering* RNA (siRNA) induceerde apoptose in A172 cellen en beïnvloedde gedeeltelijk apoptose-inductie door rhTRAIL WT en rhTRAIL-variant D269H/E195R. Deze bevindingen geven aan dat het synergistisch effect waargenomen bij combinatietherapie van TRAIL met DMC voor een klein deel afhankelijk is van verlaagde survivin-expressie en dat dit anti-apoptotische eiwit een belangrijke rol speelt bij overleving in A172 cellen. Er blijken echter ook andere, eventueel ER-stress-onafhankelijke, mechanismen een rol te spelen bij verhoogde TRAIL-gevoeligheid door DMC, zoals celcyclus arrest [38, 39]. Onze gegevens impliceren dat DMC een potentieel antikankermiddel kan zijn voor de behandeling van GBM, en dat gecombineerde behandeling met rhTRAIL verdere apoptose-inductie kan versterken in een deel van de GBM-cellen.

DMC is een structurele analogo van het cyclooxygenase-2 (COX-2)-selectieve niet-steroïde anti-inflammatoire geneesmiddel (NSAID) celecoxib, een FDA-goedgekeurd geneesmiddel dat wordt gebruikt voor de behandeling van verschillende vormen van artritis en acute of chronische pijn. Zowel celecoxib als DMC hebben antitumor-eigenschappen [37] en remden angiogenese in een COX-2-onafhankelijke manier *in vitro* en *in vivo* [40]. Dit suggereert dat ER-stress niet alleen direct aangrijpt op tumorcellen, maar ook angiogenese remt. Interessant genoeg ontbeert DMC de COX-2 remmende functie, die in celecoxib aanwezig is, terwijl het verbeterde ER-stress-activerend potentieel laat zien [36, 41]. Daarbij kan langdurig gebruik van selectieve COX-2-remmers leiden tot levensbedreigende cardiovasculaire en gastro-intestinale problemen [42], hetgeen bij DMC niet aan de orde is. Echter, tot op heden zijn de effecten van DMC nog niet geëvalueerd in klinische studies.

In **hoofdstuk 4** hebben we het effect van fucosylering op DR4- en DR5-gemedieerde apoptose in colorectale kankercellijnen geëvalueerd door overexpressie van fucosyltransferases (FUT) 3 en 6 of L-fucose-behandeling in combinatie met de DR-specifieke rhTRAIL-varianten 4C7 (DR4) en D269H/E195R (DR5). Fucosylering is een posttranslationale modificatie waarbij fucose residuen aan glycoproteïnen of glycolipiden worden toegevoegd door middel van fucosyltransferase enzymen. Deze modificatie van celoppervlak- en uitgescheiden glycoproteïnen is essentieel voor het goed verlopen van biologische processen. Verschillende onderzoeksgroepen hebben beschreven dat fucosylering TRAIL-gevoeligheid verhoogd in darmkanker [22, 43-45] en dat FUT3- en FUT6-expressie correleert met TRAIL-gevoeligheid in een groot panel van colorectale kankercellijnen [22]. In dit hoofdstuk laten we zien dat lage FUT3- en FUT6-expressieniveaus colorectale kankercellen volledig bestand maken tegen DR5- maar niet DR4-gemedieerde apoptose, en dat verhoogde expressie van beide fucosyltransferases het synergetische effect op TRAIL-geïnduceerde apoptose voornamelijk via DR5

verbetert. Bovendien hebben we aangetoond dat behandeling met L-fucose niet alleen de proliferatie van cellen verlaagde, maar ook dat met name de TRAIL-gevoeligheid via DR5 verbeterd wordt zonder dat de behandeling invloed heeft op de DR-oppervlakte-expressieniveaus. TRAIL-geïnduceerde caspase-8- en PARP-activatie was sneller in DLD-1 cellen die FUT3 en FUT6 tot overexpressie brachten. Dit correleerde eveneens met DR4- en DR5-membraanclustering. Aangezien het bekend is dat *lipid rafts* DISC-formatie en TRAIL-geïnduceerde apoptose bevorderen door clustering van TRAIL-receptoren [46], is het waarschijnlijk dat fucosylering-geïnduceerde clustering van DRs de werkzaamheid van TRAIL-geïnduceerde apoptose op dezelfde wijze kunnen versterken. Dus, fucosylering door FUT3- en FUT6-overexpressie, of door behandeling met L-fucose, herstelde TRAIL-DR5-gemedieerde apoptose in colorectale kankercellen, hetgeen gedeeltelijk komt door het clusteren van DR4 en DR5 op het celmembraan voorafgaande op TRAIL-binding. Echter, aangezien verhoogde FUT3- en FUT6-expressie pre-clustering van beide DRs kan induceren, zullen verdere experimenten nodig zijn om de specifieke moleculaire mechanismen van de waargenomen DR-selectieve verhoogde gevoeligheid door verhoogde fucosylering te onderzoeken. Wij concluderen dat modulatie van fucosylering een veelbelovende nieuwe benadering is voor het herstellen van TRAIL-gevoeligheid in DR5-resistente colorectale kankercellen.

Aangezien fucosylering vaak is verhoogd in specifieke kankers [47], kunnen met name deze tumoren interessant zijn voor TRAIL-geïnduceerde apoptose. Momenteel worden immunohistochemische assays ontwikkeld om FUT3- en FUT6-expressieniveaus te beoordelen in menselijk tumormateriaal [48, 49], wat kan leiden tot de voorselectie van patiënten die zouden kunnen profiteren van DR5-gerichte therapie. In het geval van mutatie van het GDP-mannose-4,6-dehydratase (GMDS) gen, wat leidt tot de inactivatie van de *de novo* GDP-fucose-route [43], kan een fucose-dieet als therapie leiden tot toename van fucosylering en daardoor TRAIL-gemedieerde apoptose verbeteren. Hoewel verhoogde expressie van FUT3 en FUT6 TRAIL-gemedieerde apoptose verbetert, kunnen deze fucosyltransferase enzymen ook negatieve effecten hebben op kankers. Zo zijn FUT3 en FUT6, maar ook andere fucosyltransferases, betrokken bij de synthese van het Lewis-antigeen en correleert een verhoogd Lewis-antigeen-niveau met een slechte prognose in darmkanker [50]. Daarom moet er zorgvuldig worden gehandeld bij het gebruik van L-fucose-behandelingen in colorectale kankerpatiënten.

In **hoofdstuk 5** hebben we de nieuwe thymidylate synthase inhibitor trifluorothymidine (TFT) in combinatie met rhTRAIL in een panel van niet-kleincellige longkankercellijnen getest. TFT is een analoog van de nucleoside thymidine, één van de bouwstenen van DNA, dat gefosforyleerd kan worden door thymidine kinase (TK). TFT kan in zijn actieve monofosfaat-vorm (TF-TMP) de werking van het enzym thymidylate synthase (TS) remmen. Daarnaast kan TFT verder geactiveerd worden tot zijn trifosfaat-vorm





(TF-TTP), waardoor het in het DNA kan worden opgenomen resulterend in DNA-schade en uiteindelijk celdood [51]. In dit hoofdstuk tonen we aan dat TFT TRAIL-gevoeligheid in alle cellijnen, inclusief resistente A549 cellen, verbetert door het toepassen van het combinatieschema van 24 uur TFT en TRAIL gevolgd door 48 uur van TFT alleen. TFT remde celcyclus voortgang in de G2/M fase, wat werd bevestigd door geactiveerde Chk2 en verlaagde Cdc25c niveaus, terwijl rhTRAIL-behandeling celcyclus progressie stopte in de G1 fase, zoals bleek uit een lichte stijging van gefosforyleerd Chk1, terwijl Chk2 en Cdc25c fosforylering ongeveer gelijk bleven. TFT verbeterde TRAIL-geïnduceerde apoptose, terwijl TFT als monotherapie vooral caspase-onafhankelijke celdood induceerde. Bovendien werd aangetoond dat TFT p53-, p21-, Bax- en p53-gemedieerde DR5-celoppervlakte-expressie verhoogde, terwijl het de c-FLIP- en XIAP-expressie verlaagde. TFT is dus in staat om TRAIL-geïnduceerde apoptose te versterken door meerdere pro- en anti-apoptotische eiwitten van de extrinsieke apoptoseroute te reguleren. Op basis van onze bevindingen blijkt dat gecombineerd gebruik van TFT en TRAIL een mogelijke therapeutische strategie is voor de behandeling van niet-kleincellig longcarcinoom.

TAS-102, een nieuwe orale formulering wat uit TFT en de potente thymidine-fosforylase-remmer (TPI) bestaat en de biologische beschikbaarheid van TFT verhoogt, wordt momenteel getest in fase II en fase III klinische studies bij patiënten met uitgezaaide darmkanker welke onbehandelbaar zijn of niet reageren op standaard chemotherapieën. TFT als monotherapie wordt momenteel getest in verschillende fase I klinische trials, inclusief studies waarin de farmacokinetiek en de massabalans van oraal toegediend TFT als een component van TAS-102 wordt onderzocht bij patiënten met gevorderde solide tumoren ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Dit suggereert dat de combinatiebehandeling van rhTRAIL met TFT in de toekomst mogelijk zou kunnen zijn.

DR-stimulatie leidt ook tot activatie van een aantal kinase-cascades die kunnen bijdragen aan apoptose, maar tevens betrokken kunnen zijn bij niet-apoptotische processen, zoals stimuleren van proliferatie, overleving, migratie, invasie en angiogenese, in TRAIL-resistente tumorcellen en niet-getransformeerde cellen [52, 53]. In **hoofdstuk 6** onderzochten we de activering van p38 en JNK na TRAIL-behandeling en evalueerden we de rol van deze kinases bij het moduleren van TRAIL-geïnduceerde apoptose in TRAIL-gevoelige en -resistente niet-kleincellige longkankercellen. Voorheen werd vastgesteld dat TRAIL-stimulatie JNK en p38 activeerde door de vorming van het secundaire complex, dat bestaat uit FADD, caspase-8, RIP1 en TRAF2 [54]. TRAIL-behandeling leidde tot fosforylering van p38 en JNK1/2/3 in TRAIL-gevoelige H460 cellen, maar niet in TRAIL-resistente A549 cellen. Chemische inhibitie en siRNA-afhankelijke *knockdown* experimenten toonden de anti- en pro-apoptotische activiteiten van JNK en p38, respectievelijk, aan in TRAIL-signalering. Hoewel RIP1, een kinase waarvan is gemeld dat het MAPK-activatie kan mediëren [54], in beide cellijnen tot expressie werd gebracht,

toonden alleen H460 cellen duidelijke TRAIL-geïnduceerde klieving van RIP1. Dit correleerde met detecteerbare JNK fosforylering. Verlaagde expressie van RIP1 door *short hairpin* RNA (shRNA) of inhibitie door necrostatin-1 toonde RIP1-afhankelijke en -onafhankelijke fosforylering van p38 aan, terwijl fosforylering van JNK alleen onafhankelijk van RIP1 plaats vond. Het is interessant dat klieving van RIP1 onderdrukt wordt door JNK, maar welk moleculair mechanisme RIP1-onafhankelijke p38- en JNK-activatie door TRAIL en onderdrukking van RIP1-klieving door JNK veroorzaakt is momenteel niet bekend. Remming van caspase-8-activatie door expressie van de caspase-8 inhibitor CrmA heeft aangetoond dat TRAIL-geïnduceerde caspase-8-activiteit alleen JNK activatie beïnvloedde in H460 cellen. Het anti-apoptotische eiwit Mcl-1 werd geïdentificeerd als een *downstream* doel van p38 en JNK, aangezien siRNA-gemedieerde verlaging van Mcl-1 TRAIL-geïnduceerde apoptose sterk verbeterde in H460 cellen. Tot slot hebben we met behulp van niet-kleincellige longkankercellen tegengestelde activiteiten van TRAIL-geïnduceerde activatie van p38 en JNK op Mcl-1-expressie aangetoond. Daarom kunnen combinatietherapieën van TRAIL met p38-stimulerende middelen, of remmers van JNK of Mcl-1, de werkzaamheid van TRAIL-geïnduceerde apoptose in niet-kleincellige longkankers verbeteren.

Het is interessant dat TRAIL-geïnduceerde activatie van p38 en JNK een tweeledig effect kan hebben. Hoewel we hebben aangetoond dat activatie van p38 pro-apoptotische effecten kan hebben door verlaging van Mcl-1-expressie, hebben anderen aangetoond dat activatie van p38 de expressie van Mcl-1 verhoogd [55], of kan leiden tot verhoogde katalytische en invasieve activiteiten van Akt [56]. Daarnaast kan TRAIL-geïnduceerde activatie van JNK niet alleen leiden tot celoverleving door verhoogde expressie van Mcl-1 of TRAIL-geïnduceerde cytoprotectieve autofagie [57], maar kan ook bijdragen aan apoptose [58]. Momenteel zijn de pro- en anti-apoptotische effecten van TRAIL-geïnduceerde kinase-activatie nog niet grondig bestudeerd. Echter, wanneer deze resultaten met data van andere behandelingen word gecombineerd [59-62], is het duidelijk dat p38 en JNK, net als andere kinases [53], tweeledige effecten op TRAIL-geïnduceerde apoptose kunnen hebben. We concluderen dat TRAIL-gebaseerde combinatiestrategieën met p38-stimulerende middelen, of remmers van JNK of Mcl-1, veelbelovend kunnen zijn in specifieke situaties maar dat voorzichtigheid is geboden vanwege het tweeledige karakter van deze MAPK kinases.

De studies die beschreven worden in **hoofdstuk 3, 4 en 5** waren allemaal gericht op het verbeteren van TRAIL-gemedieerde apoptose door het gebruik van combinatiestrategieën die werken op verschillende niveaus van de TRAIL-apoptoseroute. Terwijl bleek dat fucosylering voornamelijk apoptose-inductie via DR5 verbeterde, althans in zekere mate, door het vooraf clusteren van de receptoren op het celmembraan, bleken DMC en TFT de verhouding tussen pro- en anti-apoptotische eiwitten te veranderen door verlaagde

expressie van survivin, c-FLIP en XIAP en verhoogde expressie van p53, p21, Bax en DR5. Daarnaast vonden we in **hoofdstuk 6** dat stimulatie van p38, of verlagen van JNK- of Mcl-1-expressie, TRAIL-geïnduceerde apoptose kan versterken.

De verhoogde expressie van p53, DR5 en andere pro-apoptotische eiwitten kan leiden tot verhoogde gevoeligheid voor TRAIL-geïnduceerde apoptose en dit kan worden bewerkstelligd door behandeling met chemotherapeutica of bestraling. Echter, deze behandelingen beïnvloeden niet alleen tumorcellen maar ook gezonde cellen, wat leidt tot ongewenste neveneffecten. Bovendien wordt de effectiviteit van standaardbehandelingen vaak belemmerd door blokkades in de intrinsieke apoptoseroute, meestal door inactivering van de p53-route. Daarom zou het gebruik van gerichte middelen die specifiek TRAIL-gemedieerde apoptose in tumorcellen verbeteren en minder toxische bijwerkingen veroorzaken de voorkeur hebben. Er zijn nieuwe middelen, zoals bijvoorbeeld histon deacetylase (HDAC)-remmers, die de expressie van pro-apoptotische eiwitten kunnen verhogen, maar helaas ook relatief aspecifiek in hun werkingsmechanisme zijn wat leidt tot bijwerkingen. Daarom zouden specifieke medicijnen die de anti-apoptotische machinerie aanpakken, zoals YM155 (survivin), CMH (c-FLIP), AEG35156 (XIAP) en GX15-070 (Mcl-1), een hogere therapeutische waarde kunnen hebben. Er moet echter rekening mee worden gehouden dat ook deze *small molecule inhibitors* signaaltransductie kunnen moduleren in zowel gezonde als kankercellen en daardoor toxische bijwerkingen kunnen veroorzaken.

## CONCLUSIE

We hebben aangetoond dat TRAIL-geïnduceerde apoptose in tumorcellen verbeterd kan worden door het gelijktijdig moduleren van een aantal verschillende moleculaire mechanismen. De hierop gebaseerde mogelijke combinatietherapieën moeten nog nader onderzocht worden op antitumoreffecten in *in vivo*-modellen, om meer inzicht te krijgen of ze van belang kunnen zijn bij het verbeteren van antikankertherapie.

## TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Ondanks grote vorderingen in diagnosticeren en behandelingsmethoden is kanker nog steeds één van de belangrijkste doodsoorzaken in de wereld en blijft het aantal nieuwe gevallen toenemen naarmate de wereldbevolking vergrijst, blijft groeien en er steeds vaker kanker-geassocieerde levensstijl-keuzes worden gemaakt. Biologische therapeutica zijn ontwikkeld als alternatieve strategieën voor bestraling en chemotherapeutische middelen, omdat deze conventionele therapieën ongewenste bijwerkingen veroorzaken en bovendien vaak tot resistentie leiden. RhTRAIL (dulanermin) en DR-specifieke agonisten zijn biologische therapieën die veel belangstelling krijgen, omdat ze selectief apoptose induceren in tumorcellen. Echter, ongeveer de helft van de tumorcellen blijkt

resistent voor TRAIL en daarom is het van belang om de moleculaire machinerie die TRAIL-activiteit reguleert beter te begrijpen. Studies die gericht zijn op het ontrafelen van de mechanismen achter DR-preferentie en het functioneren van de pro- en anti-apoptotische TRAIL-routes, zoals de studies in dit proefschrift, zijn nodig om rationele combinatiestrategieën te ontwikkelen om de antitumor-effecten van TRAIL te verbeteren. Gezien het feit dat DR-voorkeur en regulering van de pro- en anti-apoptotische eiwitten verschilt tussen, en zelfs binnen, tumorsoorten is het van essentieel belang om biomarkers voor toegesneden TRAIL-gebaseerde combinatiestrategieën te identificeren. Dit zal de positie van TRAIL-geïnduceerde apoptose als therapeutische strategie verstevigen.

## REFERENCES

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90
2. Ashkenazi A (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2:420-430
3. Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in Health and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:275-283
4. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104:155-162
5. Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A (2001) Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7:383-385
6. Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R, Ebbinghaus S, O'Dwyer PJ, Gordon MS, Novotny W, Goldwasser MA, Tohnya TM, Lum BL, Ashkenazi A, Jubb AM, Mendelson DS (2010) Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 28:2839-2846
7. Soria JC, Smit E, Khayat D, Besse B, Yang X, Hsu CP, Reese D, Wiezorek J, Blackhall F (2010) Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28:1527-1533
8. Soria JC, Mark Z, Zatloukal P, Szima B, Albert I, Juhasz E, Pujol JL, Kozielski J, Baker N, Smethurst D, Hei YJ, Ashkenazi A, Stern H, Amler L, Pan Y, Blackhall F (2011) Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 29:4442-4451
9. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277:818-821
10. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997) A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7:1003-1006
11. Clancy L, Mruk K, Archer K, Woelfel M, Mongkolsapaya J, Screaton G, Lenardo MJ, Chan FK (2005) Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18099-18104
12. Tur V, van der Sloot AM, Reis CR, Szegezdi E, Cool RH, Samali A, Serrano L, Quax WJ (2008) DR4-selective tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) variants obtained by structure-based design. *J Biol Chem* 283:20560-20568
13. Reis CR, van der Sloot AM, Natoni A, Szegezdi E, Setroikromo R, Meijer M, Sjollem K, Stricher F, Cool RH, Samali A, Serrano L, Quax WJ (2010) Rapid and efficient cancer cell killing mediated by high-affinity death receptor homotrimerizing TRAIL variants. *Cell Death Dis* 1:e83
14. Szegezdi E, Reis CR, van der Sloot AM, Natoni A, O'Reilly A, Reeve J, Cool RH, O'Dwyer M, Knapper S, Serrano L, Quax WJ, Samali A (2011) Targeting AML through DR4 with a novel variant of rhTRAIL. *J Cell Mol Med* 15:2216-2231
15. van der Sloot AM, Tur V, Szegezdi E, Mullally MM, Cool RH, Samali A, Serrano L, Quax WJ (2006) Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5

- receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8634-8639
16. Kelley RF, Totpal K, Lindstrom SH, Mathieu M, Billeci K, Deforge L, Pai R, Hymowitz SG, Ashkenazi A (2005) Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/ tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR)5 than DR4 to apoptosis signaling. *J Biol Chem* 280:2205-2212
  17. Gasparian ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Yagolovich AV, Popova EN, Sycheva AM, Moshkovskii SA, Kirpichnikov MP (2009) Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5. *Apoptosis* 14:778-787
  18. Reis CR, van Assen AH, Quax WJ, Cool RH (2011) Unraveling the binding mechanism of trivalent tumor necrosis factor ligands and their receptors. *Mol Cell Proteomics* 10:M110.002808
  19. Szegezdi E, van der Sloot AM, Mahalingam D, O'Leary L, Cool RH, Munoz IG, Montoya G, Quax WJ, de Jong S, Samali A, Serrano L (2012) Kinetics in signal transduction pathways involving promiscuous oligomerizing receptors can be determined by receptor specificity: apoptosis induction by TRAIL. *Mol Cell Proteomics* 11:M111.013730
  20. Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, Samali A (2009) TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL?. *Cancer Treat Rev* 35:280-288
  21. Wiezorek J, Holland P, Graves J (2010) Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clin Cancer Res* 16:1701-1708
  22. Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K, Lee D, von Goetz M, Yee SF, Totpal K, Huw L, Katta V, Cavet G, Hymowitz SG, Amler L, Ashkenazi A (2007) Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med* 13:1070-1077
  23. Saturno G, Valenti M, De Haven Brandon A, Thomas GV, Eccles S, Clarke PA, Workman P (2013) Combining trail with PI3 kinase or HSP90 inhibitors enhances apoptosis in colorectal cancer cells via suppression of survival signaling. *Oncotarget* 4:1185-1198
  24. Stegehuis JH, de Wilt LH, de Vries EG, Groen HJ, de Jong S, Kruyt FA (2010) TRAIL receptor targeting therapies for non-small cell lung cancer: current status and perspectives. *Drug Resist Updat* 13:2-15
  25. Zhang L, Fang B (2005) Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12:228-237
  26. Kuijlen JM, Bremer E, Mooij JJ, den Dunnen WF, Helfrich W (2010) Review: on TRAIL for malignant glioma therapy?. *Neuropathol Appl Neurobiol* 36:168-182
  27. Van Geelen CM, de Vries EG, de Jong S (2004) Lessons from TRAIL-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: paving the road to patient-tailored therapy. *Drug Resist Updat* 7:345-358
  28. Knight MJ, Riffkin CD, Muscat AM, Ashley DM, Hawkins CJ (2001) Analysis of FasL and TRAIL induced apoptosis pathways in glioma cells. *Oncogene* 20:5789-5798
  29. Kuijlen JM, Mooij JJ, Platteel I, Hoving EW, van der Graaf WT, Span MM, Hollema H, den Dunnen WF (2006) TRAIL-receptor expression is an independent prognostic factor for survival in patients with a primary glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 78:161-171
  30. Capper D, Gaiser T, Hartmann C, Habel A, Mueller W, Herold-Mende C, von Deimling A, Siegelin MD (2009) Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit down-regulation of caspase-8 by promoter methylation. *Acta Neuropathol* 117:445-456
  31. Qi L, Bellail AC, Rossi MR, Zhang Z, Pang H, Hunter S, Cohen C, Moreno CS, Olson JJ, Li S, Hao C (2011) Heterogeneity of primary glioblastoma cells in the expression of caspase-8 and the response to TRAIL-induced apoptosis. *Apoptosis* 16:1150-1164
  32. Song JH, Song DK, Pyrzynska B, Petruk KC, Van Meir EG, Hao C (2003) TRAIL triggers apoptosis in human malignant glioma cells through extrinsic and intrinsic pathways. *Brain Pathol* 13:539-553



33. Kouri FM, Jensen SA, Stegh AH (2012) The role of Bcl-2 family proteins in therapy responses of malignant astrocytic gliomas: Bcl2L12 and beyond. *ScientificWorldJournal* 2012:838916
34. Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Wen JM, Tao Y, Sham JS, Guan XY (2006) Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and secondary human glioblastoma. *Br J Cancer* 94:108-114
35. Fulda S, Meyer E, Debatin KM (2002) Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 21:2283-2294
36. Chuang HC, Kardosh A, Gaffney KJ, Petasis NA, Schonthal AH (2008) COX-2 inhibition is neither necessary nor sufficient for celecoxib to suppress tumor cell proliferation and focus formation in vitro. *Mol Cancer* 7:38
37. Pyrko P, Soriano N, Kardosh A, Liu YT, Uddin J, Petasis NA, Hofman FM, Chen CS, Chen TC, Schonthal AH (2006) Downregulation of survivin expression and concomitant induction of apoptosis by celecoxib and its non-cyclooxygenase-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib (DMC), in tumor cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer* 5:19
38. Kardosh A, Wang W, Uddin J, Petasis NA, Hofman FM, Chen TC, Schonthal AH (2005) Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 4:571-582
39. Ehrhardt H, Wachter F, Grunert M, Jeremias I (2013) Cell cycle-arrested tumor cells exhibit increased sensitivity towards TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Dis* 4:e661
40. Lin HP, Kulp SK, Tseng PH, Yang YT, Yang CC, Chen CS, Chen CS (2004) Growth inhibitory effects of celecoxib in human umbilical vein endothelial cells are mediated through G1 arrest via multiple signaling mechanisms. *Mol Cancer Ther* 3:1671-1680
41. Pyrko P, Kardosh A, Liu YT, Soriano N, Xiong W, Chow RH, Uddin J, Petasis NA, Mircheff AK, Farley RA, Louie SG, Chen TC, Schonthal AH (2007) Calcium-activated endoplasmic reticulum stress as a major component of tumor cell death induced by 2,5-dimethyl-celecoxib, a non-coxib analogue of celecoxib. *Mol Cancer Ther* 6:1262-1275
42. Schonthal AH, Chen TC, Hofman FM, Louie SG, Petasis NA (2008) Celecoxib analogs that lack COX-2 inhibitory function: preclinical development of novel anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 17:197-208
43. Moriwaki K, Noda K, Furukawa Y, Ohshima K, Uchiyama A, Nakagawa T, Taniguchi N, Daigo Y, Nakamura Y, Hayashi N, Miyoshi E (2009) Deficiency of GMDS leads to escape from NK cell-mediated tumor surveillance through modulation of TRAIL signaling. *Gastroenterology* 137:188-98, 198.e1-2
44. Moriwaki K, Narisada M, Imai T, Shinzaki S, Miyoshi E (2010) The effect of epigenetic regulation of fucosylation on TRAIL-induced apoptosis. *Glycoconj J* 27:649-659
45. Moriwaki K, Shinzaki S, Miyoshi E (2011) GDP-mannose-4,6-dehydratase (GMDS) deficiency renders colon cancer cells resistant to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor- and CD95-mediated apoptosis by inhibiting complex II formation. *J Biol Chem* 286:43123-43133
46. Rossin A, Derouet M, Abdel-Sater F, Hueber AO (2009) Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. *Biochem J* 419:185-92, 2 p following 192
47. Christiansen MN, Chik J, Lee L, Anugraham M, Abrahams JL, Packer NH (2013) Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*
48. Stern HM, Padilla M, Wagner K, Amler L, Ashkenazi A (2010) Development of immunohistochemistry assays to assess GALNT14 and FUT3/6 in clinical trials of dulanermin and drozitumab. *Clin Cancer Res* 16:1587-1596
49. de Albuquerque Vasconcelos JL, de Almeida Ferreira S, de Lima AL, de Melo Rego MJ, Bandeira AR, de Lima Bezerra

- Cavalcanti C, de Melo Lira MM, Beltrao EI (2013) Comparing the Immunoexpression of FUT3 and FUT6 between Prostatic Adenocarcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia. *Acta Histochem Cytochem* 46:105-109
50. Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T (2008) Biological function of fucosylation in cancer biology. *J Biochem* 143:725-729
  51. Temmink OH, Emura T, de Bruin M, Fukushima M, Peters GJ (2007) Therapeutic potential of the dual-targeted TAS-102 formulation in the treatment of gastrointestinal malignancies. *Cancer Sci* 98:779-789
  52. Gonzalez F, Ashkenazi A (2010) New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29:4752-4765
  53. Azijli K, Weyhenmeyer B, Peters GJ, de Jong S, Kruyt FA (2013) Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ* 20:858-868
  54. Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, Lawrence D, Renz M, Vucic D, Ashkenazi A (2005) Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 280:40599-40608
  55. Son JK, Varadarajan S, Bratton SB (2010) TRAIL-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of MCL-1. *Cell Death Differ* 17:1288-1301
  56. Sun BK, Kim JH, Nguyen HN, Kim SY, Oh S, Lee YJ, Song JJ (2011) TRAIL-induced caspase/p38 activation is responsible for the increased catalytic and invasive activities of Akt. *Int J Oncol* 38:249-256
  57. He W, Wang Q, Xu J, Xu X, Padilla MT, Ren G, Gou X, Lin Y (2012) Attenuation of TNFSF10/TRAIL-induced apoptosis by an autophagic survival pathway involving TRAF2- and RIPK1/RIP1-mediated MAPK8/JNK activation. *Autophagy* 8:1811-1821
  58. Herr I, Wilhelm D, Meyer E, Jeremias I, Angel P, Debatin KM (1999) JNK/SAPK activity contributes to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 6:130-135
  59. Liu X, Qiu F, Liu Z, Lan Y, Wang K, Zhou PK, Wang Y, Hua ZC (2014) Urokinase-type plasminogen activator receptor regulates apoptotic sensitivity of colon cancer HCT116 cell line to TRAIL via JNK-p53 pathway. *Apoptosis*
  60. Song IS, Jun SY, Na HJ, Kim HT, Jung SY, Ha GH, Park YH, Long LZ, Yu DY, Kim JM, Kim JH, Ko JH, Kim CH, Kim NS (2012) Inhibition of MKK7-JNK by the TOR signaling pathway regulator-like protein contributes to resistance of HCC cells to TRAIL-induced apoptosis. *Gastroenterology* 143:1341-1351
  61. Lamy V, Bousserouel S, Gosse F, Minker C, Lobstein A, Raul F (2011) Lupulone triggers p38 MAPK-controlled activation of p53 and of the TRAIL receptor apoptotic pathway in human colon cancer-derived metastatic cells. *Oncol Rep* 26:109-114
  62. Lepage C, Leger DY, Bertrand J, Martin F, Beneytout JL, Liagre B (2011) Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Lett* 301:193-202





## DANKWOORD

Ik ben met enthousiasme aan dit promotietraject begonnen en ben er gelukkig ook mee geëindigd, maar het moet gezegd worden dat het aloude gezegde “De laatste loodjes wegen het zwaarst” ook hier geldt. Uiteraard heb ik dit promotietraject niet in mijn eentje doorlopen en wil daarom graag de volgende mensen bedanken voor hun bijdrage aan dit proefschrift.

Ik wil graag mijn promotores **prof. dr. W.J. Quax** en **prof. dr. F.A.E. Kruyt** bedanken voor het helpen aanvragen van de Ubbo Emmius beurs, hun vertrouwen in mij als PhD student en hun begeleiding. Beste Wim, bedankt voor het in de gaten houden van het grote plaatje en het goed kunnen inschatten van de waarde van alle data. Ondanks dat je het vanwege je nevenwerkzaamheden erg druk hebt, heb je altijd tijd gemaakt om mijn zoveelste versie na te kijken. Beste Frank, bedankt voor alle besprekingen en het in context plaatsen van de data om zo het artikel voor ogen te krijgen. Aan ideeën hebben we nooit een gebrek gehad en ik denk dat er daarom nog genoeg ligt om andere (PhD-) studenten nog een tijdje aan het werk te houden. Ik heb veel van jullie geleerd en dat waardeer ik zeer.

Daarnaast wil ik graag het **Ubbo Emmius Scholarship Programme** bedanken voor de financiële steun van mijn promotietraject. Hoewel het originele idee was om te werken aan *TRAIL-based ovarian cancer stem cell therapy* bleek dit uiteindelijk niet mogelijk te zijn en heb ik het roer halverwege moeten omgooien. Hoewel het niet gelukt is om het oorspronkelijke idee uit te voeren zijn we wel veel te weten gekomen over kankerstemcellen en dit is iets waar andere PhD-studenten aan verder kunnen werken.

De leden van de beoordelingscommissie, **prof. dr. J. Borst**, **prof. dr. E. Vellenga** en **prof. dr. R.P.H. Bischoff**, wil ik hartelijk bedanken voor het kritisch lezen en beoordelen van mijn proefschrift.

Het project waar ik aan werkte is de helft van een Ubbo Emmius *twin project* en ik wil daarom graag de andere mensen bedanken die hier deel van uitmaken: **prof. dr. E. Vellenga**, **prof. dr. J.J. Schuringa** en **M.C.J. Bosman**. Beste Edo, J.J. en Matthieu, bedankt voor de meetings die met name in de eerste paar jaar plaats vonden. Ik vond het fijn dat ik onze ideeën met jullie kon bespreken en om jullie mening daarover te horen.

Een artikel schrijven is altijd een *joint effort*. Daarom wil ik graag alle co-auteurs van de artikelen hartelijk bedanken en een paar van jullie in het bijzonder. **Dr. C.R Reis**, dear Carlos, many thanks for your help, advice and guidance especially during the last years of my PhD. I'm grateful that you still made time for our Skype meetings although you are

very busy with your new job. **Dr. K. Azijli**, lieve Kaamar (Ktje), ik ken weinig mensen die zo positief en vrolijk zijn als jij. Ondanks de afstand hebben we goed contact weten te houden. Bedankt voor alle hulp en positiviteit. **J.V. Joseph**, dear Justin, thank you for all your help, hard work and all the work-related and personal talks we had. I'm sorry for all the "birds" that I drew in your labjournal and I hope you won't hold it against me...

Uiteraard wil ik ook de professoren en projectleiders, **prof. dr. Gerrit Poelarends**, **prof. dr. Steven de Jong**, **dr. Marcel van Vugt** en **dr. Bea Wisman**, bedanken voor hun feedback en kritische vragen tijdens mijn presentaties.

Verder wil ik graag **dr. Bart-Jan Wierenga** van de afdeling Hematologie, **Klaas Sjollema** van het *UMCG Microscopy and Imaging Center (UMIC)* en **Geert Mesander**, **Henk Moes** en **Roelof Jan van der Lei** van de *Central Flowcytometry Unit (CFU)* bedanken voor al hun hulp door de jaren heen.

I want to thank all my colleagues from the departments of Pharmaceutical Biology and Medical Oncology for the pleasant working environment. As there are so many of you, I don't dare try to name all of you. However, I would like to thank a few of you in particular. First I want to thank the members of "Frank's-group-without-Frank", **Birgit**, **Judith**, **Justin**, **Kirill**, **Milind**, **Saravanan**, for the lovely dinners and lunches, the help with experiments and the long talks. I couldn't have done this without you and I wish you all the best in the future. **Roelien** and **Natalia**, the latest additions to our little group. Unfortunately I didn't have the pleasure to work with you that much but I hope you enjoy your stay at the Medical Oncology department as much as I did.

Aangezien een lab niet kan draaien zonder goede ondersteuning van lab-managers, analisten en secretaresses wil ik graag de volgende mensen bedanken. **Hetty**, **Coby**, **Rita**, **Ronald**, **Pieter**, **Gert Jan**, **Phuong**, **Wytske**, **Linda**, **Roland**, **Harry**, **Silke**, **Haukeline**, **Mirjam** en alle andere analisten die me in en rond het lab hebben geholpen. Bedankt voor alle tijd, moeite en uitleg die jullie me hebben gegeven. **Janita**, **Yvonne**, **Gretha** en **Bianca** voor alle hulp met papierwerk, afspraken maken en presentaties regelen.

Also a special thanks to all my roomies over the years: **Mariette**, **Luis**, **Esther**, **Linda**, **Jennifer**, **Marlous**, **Kirill**, **Anna**, **Carlos**, and my latest set of roommates **Magda**, **Baojie** and **Aline**. I want to thank you all for the talks, the laughter, the cookies and, on occasion, the healthy snacks.

En natuurlijk ook nog een speciaal bedankje voor het med.onco.-bordspellen-groepje: **Esm  e**, **Roelien**, **Nathalie**, **Annechien**, **Gerke**, **Rolf** en **Birgit**. Ik wil jullie graag bedanken voor de gezellige bordspellen-avondjes en ik hoop dat er nog veel zullen volgen.

I would also like to thank the students that I supervised during my PhD and contributed to my research: **Kiki, Vijay, Rima** and **Merel**. Thank you all for the hard work and enthusiasm.

Dear **Anna**, thanks for all the fun we had in and outside of work. I miss your unmatched amount of energy and the way you keep your life, and thereby everybody else's life, interesting with all your stories and adventures. I hope we will live near you and Mike someday so we can meet up more.

Ik wil nog even speciaal het groepje bedanken wat mij erg heeft geholpen tijdens mijn PhD door frustraties aan te horen, keuzes helpen te maken en mijn (geestelijke) gezondheid in de gaten te houden. Lieve **Rita**, ontzettend bedankt voor alle hulp, besprekingen en gezelligheid. We zitten je regelmatig te pesten dat je te lief en positief bent, maar ik weet dat ik (en anderen met mij) het een stuk zwaarder hadden gehad in ons promotietraject als jij er niet was geweest om te brainstormen, te helpen en een luisterend oor te bieden. Desalniettemin ben ik erg benieuwd naar Rita v10.0! Lieve **Robbert**, bedankt voor het altijd rustig blijven, het willen delen van je kennis (en je rhTRAIL-voorraad) en uiteraard je vermogen om mijn woorden in prachtige zinnen te veranderen. Ik heb veel van je geleerd, al was het alleen al dat je niet alles moet 'vernederlandsen'. Lieve **Ykelien**, supertjes bedankt voor alle gesprekken, het onder mijn attentie brengen van de meest geweldige sites en natuurlijk ook alle serieuze gesprekken. Ik ben blij dat je mijn nieuwe baas bent en hoop nog veel van je te leren.

Graag wil ik ook nog de vrienden en vriendinnen van buiten het werk bedanken voor al de welkome afleidingen tijdens mijn onderzoek. Allereerst wil ik mijn vriendinnetjes **Tjitske, Annechien, Renate, Ellen** en **Kim** bedanken voor alle steun en gezelligheid die we vanaf het eerste jaar van de studie al met elkaar delen. Het valt niet mee om dagen te vinden dat we met z'n allen kunnen samen komen en daarom zijn alle keren dat het wel lukt toch wel extra bijzonder. Ik hoop dat er nog veel Sinterklaas-/Sinterkerstavondjes, etentjes en feestjes worden georganiseerd. **Linda** en **Eelke** wil ik graag bedanken voor alle spelletjes- en pubquizavonden en de lange gesprekken waardoor we soms niet eens meer toe kwamen aan het spelletjes spelen. We vinden het jammer dat jullie binnenkort naar Sneek verhuizen, maar zullen ons niet door de afstand laten weerhouden jullie op te zoeken in jullie mooie, nieuwe huis.

Daarnaast wil ik graag **Krijn** bedanken voor je easy-going attitude, de "special-movie-nights" en alle nerdyness met jou en je mede-monkeys **Jorn, Steven, Tryck** en **Bart**. Ondanks dat je in waffleland woont houden we toch nog goed contact, go us! Ik ben benieuwd waar je na je promotie terecht komt en ik hoop dat ik je weer mag komen opzoeken in één of andere leuke stad.

Mijn paranimfen wil ik graag bedanken voor mij bijstaan op mijn promotie. Lieve **Ellen**, bedankt voor al je enthousiasme en interesse. Je bent een top-zus die altijd tijd heeft (of maakt) om lang aan de telefoon te hangen. Lieve **Tjitske**, ik ben erg blij dat ik altijd voor alles bij je terecht kan en dat we precies weten wat we aan elkaar hebben. Hoewel de kans groot is dat één van ons in de toekomst zal gaan verhuizen, ben ik niet bang dat we contact zullen verliezen.

Lieve **Ellen & Daniël, Tom & Annerieke, Albert & Margriet, Leonie & Wouter, Henk & Iet**, bedankt voor alle gezelligheid, steun en wijze raad. De laatste jaren is er van alles gebeurd en laat gelukkig alleen maar zien dat ik altijd bij jullie terecht kan. Lieve **oma van Roosmalen** en **oma van der Mierden**, ik vind het erg jammer dat jullie niet meer onder ons zijn. Ik had de dag van mijn promotie graag met jullie gedeeld en ik denk dat jullie het geweldig hadden gevonden.

Lieve **paps en mams**, bedankt voor al jullie onvoorwaardelijke steun en liefde. Ik ken geen andere mensen die zo veel en zo snel voor anderen klaar staan. Bedankt voor al het geduld, het begrip, het harde werk, het luisterende oor en natuurlijk de goede zorgen. Ik weet niet wat ik zonder jullie zou moeten.

Lieve **Christiaan**, na alles wat we hebben meegemaakt vind ik het wonderbaarlijk dat je nog steeds zo positief in het leven staat. Jouw humor, enthousiasme, liefde en relativiseringsvermogen hebben mij er in de afgelopen jaren doorheen gesleept. Ik had dit alles niet kunnen doen zonder jouw steun en begrip. Op naar wat meer rust en een lang en gelukkig leven!

*Ingrid*