

De HGF/SF-MET signaaltransductiecascade is ontregeld in vele solide tumoren (1). Aangezien *MET* gemuteerd is, tot overexpressie komt (als mRNA en eiwit), en bekend staat als organisator van de invasieve groei van hoofd-hals plaveiselcelcarcinomen (2-4), is het een interessant aangrijppunt voor therapie (target for therapy) (5, 6). Ondanks het feit dat er een velerlei aan 'targeted therapies' gericht tegen *MET* zijn ontwikkeld (7, 8), zijn er nog geen grote successen behaald met betrekking tot overleving (8, 9). Dit alles in acht genomen, naast het feit dat de behandeling van kankerpatiënten hoge kosten met zich meebrengt, zorgt ervoor dat de implementatie van op *MET* gebaseerde 'targeted therapies' in de kliniek moeizaam verloopt (10, 11).

Een verklaring voor het uitblijven van klinische successen, behaald met behulp van *MET* 'targeted therapies', zou gevonden kunnen worden in het gebrek aan betrouwbare 'companion diagnostics' (CDx) (9). Deze laatste wordt gedefinieerd als "een medische toepassing, meestal een in vitro toepassing, die essentiële informatie verleent betreffende het veilig en effectief gebruik van een bijbehorend medicijn of biologisch product" (12). De ontwikkeling van 'CDx' voor *MET* 'targeted therapies' is complex omwille van verschillende redenen (9). Sommige zijn technisch van aard, zoals het gebrek aan betrouwbare antilichamen en optimale beoordelingssystemen (7, 9, 13), terwijl andere gevonden kunnen worden in de biologie, zoals het afstoten van het ectodomein (ectodomain shedding) (9). Zodoende ligt één van de grootste uitdagingen van vandaag in het ontwerpen van valide 'CDx' die juist die patiënten identificeren die in aanmerking komen voor een behandeling met *MET* 'targeted therapies'. Bijgevolg was het primaire doel van deze scriptie om de eerste stappen te nemen in de ontwikkeling van 'CDx' voor *MET* 'targeted therapies' voor patiënten gediagnosticeerd met mondholtekanker.

In hoofdstuk 3, wordt de betrouwbaarheid van vijf commerciële C-terminale *MET* antilichamen getest met behulp van het 'Rimm Lab Algoritme voor antilichaamvalidatie' (14). Twee antilichamen voldeden aan de criteria van het algoritme en werden vervolgens gebruikt om de aard van C-terminale *MET* immunoreactiviteit over dwarsdoorsnedes van mondholte tumoren te verkennen met behulp van weefselcoupes. Het antilichaam dat het meest sensitief was in de detectie van membraneuze *MET* aankleuring – specifiek kloon D1C2 – is vervolgens gebruikt om de associatie tussen *MET* immunoreactiviteit en overleving te bestuderen in een mondholte en humaan papillomavirus (HPV) negatief orofarynx patiëntenpopulatie waarvan het geresecteerde tumormateriaal verzameld was op een weefselmicroarray (TMA). De resultaten lieten zien dat *MET* immunoreactiviteit uniform (negatief of positief) verspreid is over tumoren, of varieert tussen een tumor's centrum en periferie (variabel). Uitein-

delijk werd aangetoond dat het D1C2 uniforme aankleuringspatroon geassocieerd is met een slechte algemene en ziektevrrije overleving van patiënten zonder tekenen van vasoinvasieve groei.

Terwijl de betrouwbaarheid van de C-terminale MET antilichamen onderzocht werd in hoofdstuk 3, werden specifieke afbraakpatronen waargenomen onder gereduceerde omstandigheden. Enerzijds werden deze patronen verklaard door stress gerelateerde afbraak van MET door caspases (15, 16). Anderzijds werden ze verklaard door MET 'ectodomain shedding' en preseniline afhankelijke gereguleerde intramembraneuze proteolyse (RIPping) (17-20). Aangezien de deletie van het ectodomein het agressieve gedrag van het MET oncogen product kan ontwapenen (21), is onderzocht of de proteolyse van MET waargenomen kan worden in mondholte tumor cellijnen en weefsels. Hiervoor werden in hoofdstuk 4 twee betrouwbare antilichamen gebruikt, één gericht tegen de MET C-terminus (D1C2), de ander tegen de MET N-terminus (A2H2-3) (22). Eenmaal vastgesteld dat afbraak van MET voorkomt in mondholte tumoren, werden D1C2 en A2H2-3 naast elkaar gebruikt om de eiwit status van MET te bepalen in een mondholtekanker patiëntencohort met behulp van dezelfde TMA als beschreven in hoofdstuk 3. Dit leidde tot de indeling van MET eiwitstatus in 3 categorieën: MET negatief (geen MET), decoy MET (meer positiviteit voor A2H2-3), en transmembraneus C-terminaal MET (volledig MET (evenveel positiviteit voor D1C2 en A2H2-3), of de C-terminus van MET zonder het ectodomein (meer positiviteit voor D1C2)). Er werd ook vastgesteld dat MET 'ectodomain shedding' geassocieerd is met een slechte ziektevrrije overleving in mondholte tumoren die positief zijn voor transmembraneus C-terminaal MET. Aangezien meer dan de helft van de patiënten die uniform positief zijn voor C-terminaal MET (zoals gedefinieerd in hoofdstuk 3) onderhevig zijn aan 'ectodomain shedding', heeft dit mogelijk een impact op de keuze van type therapie, in het bijzonder 'monoclonaal antilichaam' of 'tyrosinekinaseremmer'. Uiteindelijk werd een 'CD' ontworpen voor het gebruik van 'targeted therapies' tegen MET.

In hoofdstuk 4 werden 'TMAs' gebruikt om aan te tonen en te bediscussiëren dat uniform positieve C-terminale MET immunoreactiviteit en 'ectodomain shedding' geassocieerd zijn met een slechte overleving van patiënten met een mondholte tumor. Gezien de potentiële prognostische en predictieve waarde van dit resultaat, werd onderzocht of de 'TMA' resultaten geëxtrapoleerd konden worden naar weefselcouples in hoofdstuk 5. Hier wordt een nieuw scoringssysteem gepresenteerd dat vier aankleuringspatronen over kankervelden beschrijft: uniform negatief, uniform positief, gradiënt richting de periferie, en gradiënt richting het centrum.

Deze aankleuringspatronen vinden hun oorsprong in de in hoofdstuk 3 beschreven membraneuze D1C2 immunoreactiviteit. Aangezien bekend is dat MET 'epitheel tot mesenchym transitie' (EMT) reguleert (23, 24), werden de resultaten vergeleken met verlies van E-cadherine, een maatstaf voor 'EMT' die geassocieerd is met slechte prognose (25, 26). Het naast elkaar leggen van C- en N-terminale MET, alsook E-cadherine immunoreactiviteit, door middel van het ontwikkelde scoringsysteem, geeft inzicht in: MET eiwitstatus, 'ectodomain shedding' en 'EMT'. Daarnaast is het scoringsysteem prognostisch informatief voor C-terminaal MET positieve tumoren met betrekking tot: uniforme positiviteit van D1C2, 'ectodomain shedding' en verlies van E-cadherine. De overeenkomsten tussen hoofdstukken 4 en 5 betreffende overleving, doen ons geloven dat onze bevindingen in relatie tot C-terminale MET immunoreactiviteit en 'ectodomain shedding' de ontwikkeling van 'CDx' voor MET 'targeted therapies', kunnen ondersteunen en toepasbaar zijn in de routine van een diagnostische setting.

Na te hebben vastgesteld dat D1C2 uniform positiviteit geassocieerd is met een slechte algemene en ziektevrije overleving van patiënten met een mondholte tumor die gemiddeld meer C-terminale dan N-terminale MET immunoreactiviteit vertoont, en wetende dat MET de invasieve groei van mondholte tumoren organiseert, werd onderzocht of C-terminale MET uniform positiviteit geassocieerd is met de aanwezigheid van halsmetastasen in kleine mondholte tumoren in hoofdstuk 6. Aangezien de NCCN adviseert om invasiediepte (DOI) te gebruiken als beslismodel voor het uitvoeren van een electieve halsdissectie, werden de resultaten voor C-terminale MET uniform positiviteit uitgelijnd tegen die van 'DOI' > 4 mm, de afkapwaarde die aangehouden wordt in het Erasmus MC. De resultaten van deze studie laten zien dat C-terminale MET uniform positiviteit in sterkere mate geassocieerd is met de aanwezigheid van halsmetastasen (pN+ en occult) in kleine mondholte tumoren dan 'DOI'. C-terminale MET uniform positiviteit kan om deze reden een rol spelen in het maken van de klinische beslissing al dan niet een electieve halsdissectie uit te voeren.

Wetende dat MET 'ectodomain shedding' voorkomt (hoofdstukken 3 – 5) en geassocieerd is met slechte overleving in mondholte tumoren (hoofdstukken 4 en 5), werd een perspectief geschreven aangaande de kwaadaardige potentie van dit proces en de predictieve waarde hiervan in mondholte tumoren (hoofdstuk 7). In dit stuk wordt voorgesteld dat MET 'ectodomain shedding', als gevolg van G-eiwitgekoppeldereceptor transactivatie van epidermale groeifactorreceptor signalering, en/of overexpressie van ADAM10/17, en/of MET, een membraangebonden MET fragment

zonder ectodomein (MET-EC) stabiliseert en mogelijk activeert in mondholte tumoren. Om deze reden werd geconcludeerd dat 'MET-EC' verwerkt moet worden in het ontwerp van 'CDx' met het oog op het verbeteren van patiëntenstratificatie en uiteindelijk een langere overleving.

De eerste stappen werden genomen in het ontwerp van een 'CD' waarin 'MET-EC' verwerkt wordt in hoofdstukken 4, 5, en 7. In dit ontwerp werd aangenomen dat alleen patiënten met tumoren positief voor het katalytische domein van het eiwit mogelijk in aanmerking komen voor een behandeling met MET 'targeted therapies'. Bijgevolg werd aangenomen dat alleen tumoren positief voor transmembraneus C-terminaal MET (compleet MET en/of 'MET-EC') mogelijk gevoelig zijn voor MET 'targeted therapies'. Uiteindelijk wordt aanbevolen om MET 'monoclonale antilichamen' of 'tyrosinekinaseremmers' te gebruiken voor tumoren die positief zijn voor de volledige receptor, en 'tyrosinekinaseremmers' of een combinatie van beiden voor 'MET-EC' tumoren.

Uiteindelijk werd geconcludeerd dat D1C2 uniform positiviteit en 'MET-EC' geassocieerd zijn met slechte overleving en mogelijk kunnen helpen in de stratificatie van patiënten met een mondholte tumor die in aanmerking komen voor behandeling met MET 'targeted therapies'. Er werd ook geconcludeerd dat C-terminale MET (D1C2) uniform positiviteit geassocieerd is met de aanwezigheid van lymfekliermetastasen (pN+ en occult) in kleine mondholte tumoren en mogelijk kan helpen in de klinische beslissing al dan niet een electieve halsdissectie uit te voeren. Tevens werd gespeculeerd dat MET immunoreactiviteit een optimale behandeling van de hals kan faciliteren, alsook resistentie/gevoeligheid voor – systemische – therapie kan voorspellen. Hierom menen wij dat MET immunoreactiviteit zal bijdragen aan klinische beslissingen en patiëntenvoorlichting, om uiteindelijk gedeelde besluitvorming te verbeteren. Alles in acht genomen, durven we hier te stellen dat MET immunoreactiviteit een waardevolle biomarker is in het veld van mondholte tumoren.