

# EGFRvIII : molecular insights and therapeutic potential

## Citation for published version (APA):

Jutten, B. (2014). *EGFRvIII : molecular insights and therapeutic potential*. Maastricht University.

## Document status and date:

Published: 01/01/2014

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

---

Nederlandse samenvatting

---

## Samenvatting

Deze thesis beschrijft hoe de Epidermale Groei Factor Receptor (EGFR) en een van de meest voorkomende afwijkende (mutant) vorm, variant III (EGFRvIII), bijdragen aan de agressiviteit van een tumor. Tevens worden nieuwe behandeling mogelijkheden besproken voor patiënten met een tumor met ontregelde EGFR signalering.

EGFR is een lid van de ErbB familie van receptoren welke bestaat uit 4 leden; EGFR (Erb1, HER1), Erb2 (HER2), Erb3 (HER3) en Erb4 (HER4). EGFR wordt geactiveerd door binding van een ligand, hierdoor verandert de receptor van conformatie. Door deze vormverandering kunnen twee EGFR moleculen een interactie aangaan, dimeriseren (homo-dimeren) of dimeriseren met een ander lid uit de ErbB-familie (hetero-dimeren). Dimerisatie leidt tot phosphorylatie aan de binnenkant van de cel waardoor signalering geactiveerd wordt. EGFR werkt via verschillende signaleringroutes die de cel aanzetten tot gen expressie, cytoskelet veranderingen, remming van geprogrammeerde celdood (apoptose), toename van celgroei en deling en zorgt ervoor dat de tumorcel een fenotype krijgt dat lijkt op dat van 'tumorstemcellen'. Niet lang na de ontdekking van de ErbB receptor familie, in de vroege jaren '80, werden deze al geassocieerd met kanker. In veel kankersoorten zijn de ErbB signalering routes hyper-geactiveerd door o.a. overproductie van liganden, overproductie van receptoren (amplificatie) of door continue activatie van de receptoren.

Hierdoor wordt amplificatie van het EGFR gen geassocieerd met resistentie tegen radiotherapie door de activatie van overlevingssignalering en DNA-herstel mechanismen door EGFR. Onderbreking van EGFR signalering kan daarom beschouwd worden als een mogelijke strategie om tumoren gevoeliger te maken voor behandeling. Ondanks het feit dat er al veel onderzoek is gedaan naar het remmen van EGFR signalering met behulp van medicijnen die de phosphorylatie tegen gaan (TKIs) en met antilichamen die de dimerisatie voorkomen, blijken deze in de praktijk slechts effectief te zijn in een beperkte groep patiënten.

Recent onderzoek heeft uitgewezen dat kanker gerelateerde mutaties in bijvoorbeeld het k-RAS- of PTEN gen kan leiden tot ongecontroleerde celgroei en deling ondanks de blokkade van EGFR signalering. Verder kunnen

verschillende strategieën om EGFR signalering te blokkeren (TKIs versus antilichamen) verschillende resultaten kunnen opleveren in dezelfde tumor. Compensatie via andere receptoren, inclusief mutaties in EGFR, zijn waarschijnlijk de reden hiervoor.

De meest voorkomende mutatie van EGFR is de zogenoemde variant 3 of EGFRvIII. EGFRvIII staat bekend voor zijn bedrage aan de radioresistentie van tumorcellen, o.a. door zijn bedrage aan DNA herstel na bestraling. Verder leidt EGFRvIII expressie tot resistentie tegen Gefitinib (een TKI) en tot constante EGFR signalering. We hebben daarom onderzocht of tumorcellen met EGFRvIII expressie behandeld kunnen worden met Cetuximab, een antilichaam tegen EGFR. Cetuximab voorkomt de binding van een ligand aan domein I en III van EGFR. EGFRvIII mist een groot deel van domein I en II. Daarom stelde wij ons de vraag of Cetuximab zou binden aan EGFRvIII en of deze binding dan een functionele therapeutische waarde zou hebben? In hoofdstuk 2 laten wij zien dat Cetuximab inderdaad kan binden aan EGFRvIII. Deze binding leidde tot een verminderde expressie van EGFRvIII op de cel. Dit had echter geen effect op de groeisnelheid van deze cellen. Mogelijk geeft de expressie van EGFRvIII onder normale omstandigheden geen groeivoordeel of de vermindering in EGFRvIII expressie was niet voldoende om een effect te hebben. Verder leidde de behandeling met Cetuximab ook niet tot radiosensitisatie, suggererend dat voldoende EGFRvIII nog aanwezig is om radioresistentie te handhaven. Toch was de ERK signalering verminderd in EGFRvIII cellen wanneer deze behandeld werden met Cetuximab. Dit suggereert dat Cetuximab EGFRvIII signalering vermindert en zou mogelijk gebruikt kunnen worden voor de behandeling van tumoren met lage EGFRvIII expressie.

In de dagelijkse klinische routine worden de hoeveelheid van en de mutaties in EGFR bepaald om een optimale behandeling van de patiënt te bereiken. Tevens worden mutaties in signaleringmoleculen van EGFR bepaald omdat mutaties hierin kunnen leiden tot ongevoeligheid van de tumor tegen anti-EGFR behandelingen. De expressie van EGFRvIII wordt echter niet meegenomen in deze analyse ondanks bewezen klinische relevantie en de verlaagde effectiviteit van de anti-EGFR therapie door EGFRvIII. Tumorcellen die EGFRvIII tot expressie brengen zijn resistenter tegen Gefitinib en hebben dus

---

meer en hogere dosissen nodig. Deze hogere dosissen zijn echter niet voldoende om alle processen die leiden tot therapieresistentie van EGFRvIII stil te leggen. Mogelijk is het ontbreken van een goed commercieel verkrijgbaar antilichaam specifiek voor EGFRvIII een reden voor het niet testen op EGFRvIII expressie. Wij hebben daarom getracht een EGFRvIII specifiek antilichaam te genereren afgeleid van een lama antilichaam (hoofdstuk 3). Dit EGFRvIII specifiek mini-antilichaam of nanobody zou gebruikt kunnen worden in combinatie met een eerder gevonden nanobody tegen normaal EGFR, om de expressie niveaus van EGFR en EGFRvIII te bepalen. Met deze nanobodies kan dit zowel in de patiënt als in verwijderd tumormateriaal. Het ontwikkelde antilichaam had hoge affiniteit voor EGFRvIII, maar bleek ook te binden aan normaal EGFR wanneer dit in grote hoeveelheden aanwezig was. Dit maakt het nanobody tegen EGFRvIII ongeschikt voor het stellen van een goede diagnose omdat EGFRvIII expressie vaak gepaard gaat met een hoge expressie van normaal EGFR.

In hoofdstuk 4 hebben we onderzocht hoe tumorcellen met EGFR en EGFRvIII expressie verschillend omgaan met de stress die hoort bij het tumor-micro milieu, zoals lage zuurstof concentratie of weinig voedingsstoffen. Wij zagen dat cellen met EGFRvIII sneller bleven groeien wanneer ze weinig zuurstof of voedingsstoffen kregen. Dit bleek specifiek voor EGFRvIII aangezien cellen met EGFR dit niet vertoonden. Tevens observeerden we dat de cellen met EGFRvIII beter overleefden dan controle cellen of cellen met EGFR wanneer ze weinig zuurstof of voedingsstoffen kregen. Ook tumoren die voortkwamen uit de cellen met EGFRvIII groeiden sneller. Deze verhoogde groeisnelheid kon worden teruggebracht wanneer EGFRvIII productie in de cel werd uitgezet. Deze bevindingen suggereren dat het remmen van EGFRvIII expressie en/of een blokkade in de signaleringsroute een veelbelovende strategie kunnen zijn in de behandeling van tumoren met EGFRvIII expressie.

Cellen met EGFRvIII groeien sneller en overleven beter wanneer ze blootgesteld worden aan weinig zuurstof (hypoxie) of voedingsstoffen (starvatie) vergeleken met cellen zonder EGFRvIII. In hoofdstuk 5 hebben we aangetoond dat remming van autofagie (een proces dat de cel gebruikt om beschadigde onderdelen af te breken en hergebruiken) in cellen met EGFRvIII leidt tot een verlaagde groei en overleving wanneer ze blootgesteld worden aan hypoxie of

starvatie. Cellen met EGFRvIII zijn zelfs gevoeliger voor remming van autofagie wanneer ze blootgesteld worden aan hypoxie of starvatie dan cellen zonder EGFRvIII. Vergelijkbaar met eerdere experimenten, zagen we dat tumoren met EGFRvIII expressie sneller groeiden en ook sneller terug groeiden na radiotherapie in vergelijking met tumoren zonder EGFRvIII expressie. Opvallend was dat chloroquine (CQ, een medicijn dat autofagie remt) behandeling deze versnelde groei en hergroei teniet kon doen. De onderliggende mechanismen hierbij moeten nog worden uitgezocht. Intuïtief zou men verlaagde autofagie verwachten in cellen met EGFRvIII omdat een van de belangrijkste signaleringsroutes van EGFR, de zo gehete mTOR signalering, juist lijdt tot verlaagde autofagie. Voorlopige data wijzen erop dat een ander signaleringsroute, de RAS-RAF signalering, een meer belangrijke rol in de verhoogde autofagie van cellen met EGFRvIII speelt.

Autofagie wordt noch transcriptioneel noch translationeel gereguleerd. Desondanks is voldoende transcriptie en translatie nodig om voldoende autofagie flux te behouden. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) signalering zou verantwoordelijk kunnen zijn voor het behoud van de verhoogde autofagie flux in EGFRvIII cellen tijdens zuurstof tekort via Protein Kinase R (PKR) en eIF2 $\alpha$ . Recent is een vierde autofagie regulerende signalering van EGFR ontdekt. EGF geactiveerd EGFR phosphoryleert Beclin 1 op 3 tyrosines waardoor Beclin 1 dimeren vormt en niet meer aan het Vps34 complex kan binden en daardoor autofagie niet kan activeren. Dit kan mogelijk verklaren waarom cellen met EGFR overexpressie lage base autofagie flux hebben zoals beschreven in hoofdstuk 6. Echter, de exacte mechanismen die hierbij een rol spelen moeten nog verder worden uitgezocht.

Analyse van een cohort van 52 glioblastoma patiënten (18 conventioneel en 34 met additioneel CQ behandeld) werden grote toenames in overleving gezien. Patiënten met een EGFRvIII negatieve tumor hadden een toename in overleving van 5 naar 10 maanden na diagnose, waar patiënten met een EGFRvIII positieve tumor een toename van 3 naar 15 maanden hadden. Deze resultaten zijn in lijn met de verkregen preklinische data. Enige voorzichtigheid is echter geboden omdat het een relatief kleine groep is. Echter, deze veel belovende resultaten dienen verder onderzocht te worden in gerandomiseerde studies met patiënten stratificatie gebaseerd op EGFRvIII expressie.

---

Samengevat, de inhibitie van autofagie door middel van CQ is een veelbelovende toevoeging voor de therapie van EGFRvIII positieve tumoren. Om de relatie tussen niet-gemuteerd EGFR en autofagie te bepalen werden glioblastoma cellen met EGFR overexpressie in een xenograaft model gebruikt en de effectiviteit van CQ behandeling getest, zoals beschreven in hoofdstuk 6. CQ behandeling leidde tot een afname in de groei van tumoren met EGFR overexpressie. Zoals verwacht waren tumoren met EGFR overexpressie zeer resistent tegen radiotherapie. Deze resistente tumoren konden gevoelig gemaakt worden voor radiotherapie door CQ behandeling, zoals gezien met de EGFRvIII tumoren (hoofdstuk5). CQ behandeling op zich zelf vertraagde de groei van tumoren met EGFR overexpressie zelfs meer dan de radiotherapie (enkele dosis van 10Gy).

Opvallend was dat dit niet kwam door de afname van de hypoxische fractie, zoals we in het verleden gezien hebben. Noch de necrotische of de apoptotische fractie leken beïnvloed te worden door CQ behandeling. Dit suggereert dat niet alleen de cellen met weinig zuurstof maar ook andere cellen getarget worden en geeft aan dat cellen met EGFR overexpressie sterk afhankelijk zijn van autofagie voor hun overleving. Tevens werd in xenografts van primaire hoofd-hals tumoren een positieve relatie gevonden tussen LC3b en EGFR RNA en eiwit expressie. Dit suggereert dat EGFR betrokken is in de productie van LC3b. Ondanks dat LC3b voornamelijk gemaakt wordt in hypoxische gebieden van een tumor, werd deze correlatie niet gevonden in tumoren met EGFR overexpressie. Dit suggereert dat andere cellen dan die met te weinig zuurstof (bij-voorbeeld die cellen die te weinig voedingsstoffen krijgen) getarget worden. Dit vermoeden werd versterkt doordat de meeste LC3b expressie in hoofd-hals tumoren met EGFR overexpressie gevonden werd in de niet-hypoxische gebieden. Samengevat, de tumoren met hoge EGFR expressie gebruikt in deze studie zijn erg afhankelijk van autofagie voor hun groei, overleving en resistentie tegen radiotherapie. Het blokkeren van autofagie kan daarom een goede additionele behandeling zijn voor tumoren met EGFR overexpressie.

## Tot slot

Sinds de ontdekking in begin jaren 80 is er veel onderzoek gedaan naar EGFR.

In veel verschillende kankersoorten is de EGFR signaleringsroute over actief om verschillende redenen zoals overproductie van de liganden, overproductie van de receptor of constante activatie van de receptor door mutaties. Daarom worden tumoren in klinische setting getest op EGFR en gerelateerde signalering moleculen om de juiste diagnose en behandeling te bepalen. Opvallend hierbij is dat EGFRvIII hierin niet wordt meegenomen ondanks een toenemende hoeveelheid aan onderzoeks- en klinische data die suggereren dat EGFRvIII expressie een negatieve invloed heeft op de behandeling en de overleving van de patiënt. Daarom zou in een klinische setting het routinematig testen van tumoren op EGFRvIII overwogen moeten worden.

Veel therapieën gericht tegen EGFR zoals TKIs en antilichamen die zeer effectief zijn in het laboratorium blijken maar minimaal succesvol in de klinische praktijk. Tumoren kunnen resistent worden tegen de behandeling door compensatie mechanismen te activeren of de expressie van EGFRvIII.

In dit proefschrift beschrijven we een potentieel nieuwe toevoeging aan de therapie om tumoren met EGFR en EGFRvIII overexpressie te behandelen. We hebben laten zien dat tumoren met zowel EGFR als EGFRvIII overexpressie zeer sterk reageren op inhibitie van autofagie door middel van CQ. Verder blijkt dat CQ in combinatie met conventionele behandeling goed werkt en zelfs beter in patiënten met een tumor met EGFRvIII. Meer en grotere klinische trials zijn echter nodig om de effectiviteit van CQ in de behandeling van (EGFRvIII positieve) hersentumoren vast te stellen.

Het ontrafelen van de exacte autofagie signalering routes van EGFR en EGFRvIII in tumoren zou nieuwe inzichten kunnen opleveren over hoe deze meer efficiënt behandeld kunnen worden. Veel inhibitoren van signalering moleculen van EGFR zoals PI3K, mTOR, RAS of RAF zijn momenteel beschikbaar voor onderzoek of worden zelfs al toegepast in de kliniek. De combinatie van deze inhibitoren en anti-EGFR therapie zou nieuwe behandeling strategieën kunnen opleveren.

Men beseft meer en meer dat enkelvoudige therapieën niet effectief genoeg zijn tegen de meeste kanker soorten en dat nieuwe behandelingsstrategieën gezocht moeten worden in combinaties van bestaande of nieuwe therapieën. In dat licht zouden patiënten met een glioblastoma behandeld kunnen worden met Avastin (Bevacizumab, een antilichaam tegen Vascular Endothelial growth



---

factor (VEGF) welk de aanmaak van nieuwe bloedvaten tegen gaat) in combinatie met inhibitie van autofagie en radiotherapie. Behandeling met Bevacizumab leidt tot een toename van de hypoxische fractie van een tumor. Wanneer dit dan gecombineerd wordt met CQ is een toename in tumorceldood te verwachten en wordt de effectiviteit van Bevacizumab als enkelvoudige therapie verhoogd. Hiermee kan de hergroei van de tumor na bestraling uitgesteld of zelfs voorkomen worden.

Een andere mogelijkheid om tumoren met EGFRvIII expressie te bestrijden is door middel van vaccinatie. EGFRvIII is ideaal als vaccinatie kandidaat omdat het alleen voorkomt op tumorcellen en niet op normaal weefsel. Vaccinatie van patiënten met een EGFRvIII positieve tumor met een EGFRvIII peptide leverde een 5-voudige toename in overleving. Echter, Natural Killer (NK) cellen zijn minder effectief in een hypoxische omgeving en tumor cellen gebruiken autofagie als bescherming tegen cytotoxische T lymfocyten (CTLs). De combinatie van radiotherapie, CQ en vaccinatie zou daarom alle normoxische en hypoxische cellen moeten vernietigen. Deze benadering richt zich niet alleen op 'normale' tumor cellen maar ook op de zeer radioresistente glioblastoma kanker stem cellen (CSC) welke EGFRvIII tot expressie brengen.

Samengevat, ondanks enkele decennia aan onderzoek, nieuwe anti-EGFR medicijnen en klinische trials, blijven tumoren met EGFR en EGFRvIII expressie zeer moeilijk te behandelen. Daarom is meer onderzoek nodig om alle mechanismen die hierbij een rol spelen te onderzoeken een zo best mogelijke behandeling te bereiken.