

Translationele OncoProteomics: *Over vertalen van (fosfo)eiwit fingerprints*

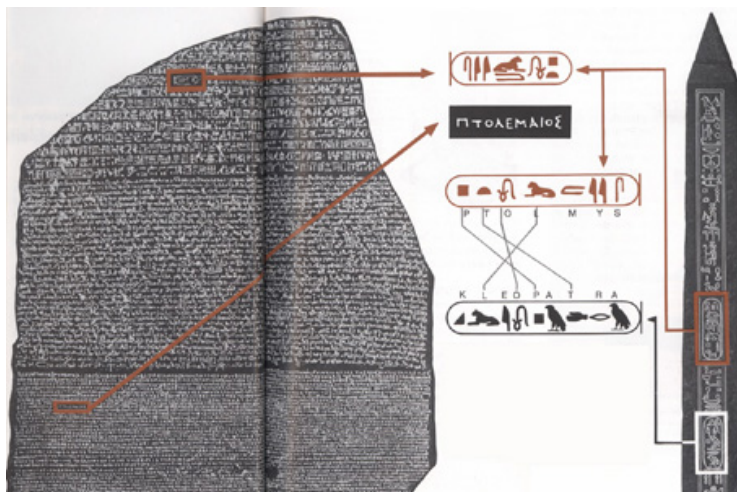
Oratie 14 dec. 2016, Connie Jimenez

Mijnheer de rector, dames en heren,

I. Inleiding & uitleg leerstoel

Vertalen: Steen van Rosetta: van Grieks naar Hiërogliefen

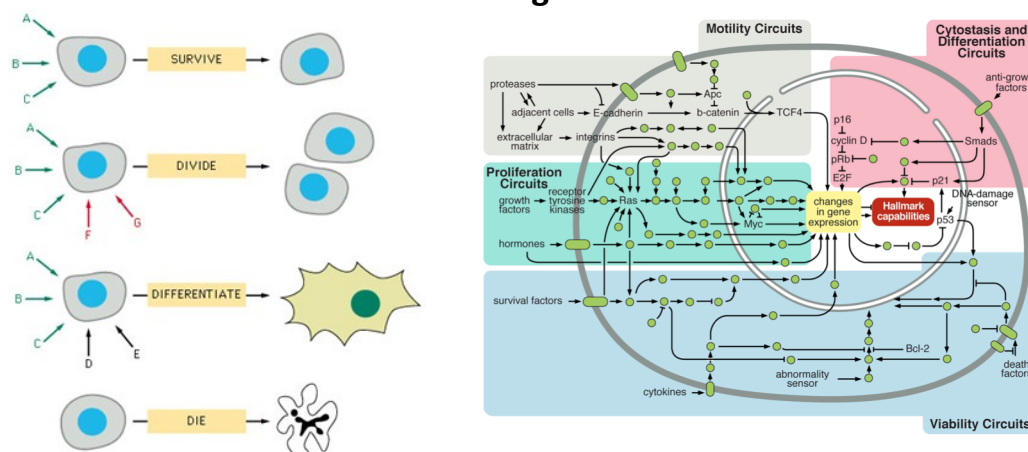
De Steen van Rosetta is een donkere granieten steen die bij toeval in 1799 door franse soldaten werd ontdekt bij de Egyptische plaats Rosetta, tijdens een slag tussen het leger van Napoleon en de Britten. Op de steen, die uit 196 v. Chr. stamt, staat in drie talen een besluit van de prieterraad: in **hiërogliefen**, de schrijfwijze voor heilige zaken, in het **demotisch**, de vereenvoudigde schrijfwijze die door iedereen uit het volk werd gebruikt, en in het **Grieks**, de taal voor de administratie in de tijd van de Griekse heersers over Egypte. Dit was een gouden combinatie om het geheim van de Egyptische tekens te ontrafelen, want Grieks was immers wel een bekende taal. Echter, het was toch geen inkopper! Champollion deed er zo'n 14 jaar over om het hiërogliefenschrift te ontcijferen. Dat kwam omdat hij het tot 1815 moest doen met slechte kopieën en gravures.



<http://rdejong.blogspot.nl/2012/05/champollion-en-het-raadsel-van-het.html>

Door zoveel mogelijk bronnen te verzamelen, kon hij bepalen hoeveel verschillende schrifttekens er werden gebruikt en of het schrift alfabetisch was met enkele tientallen tekens, syllabisch met ongeveer honderd tekens of ideografisch met duizenden tekens. Deze analyse, samen met het inzicht dat de - ovale vormen ofwel cartouches- de namen van koningen bevatten, was een belangrijke doorbraak in het onderzoek. De steen van Rosetta vormde dus een belangrijke sleutel voor het ontcijferen van hiërogliefen in 1822.

Vertalen: Cel: Van extracellulair signaal naar celfunctie

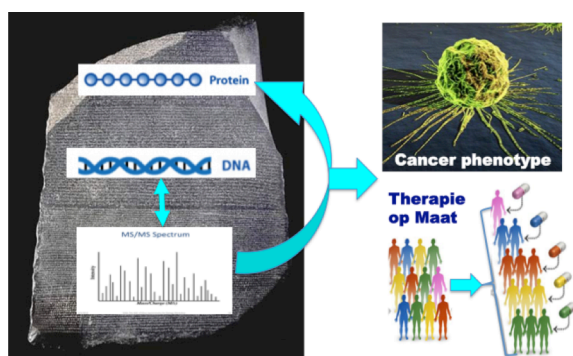


Intracellulaire signaleringsnetwerken reguleren de functies van de kankercel (Hanahan and Weinberg, Cell 2011)

Nu over naar de biologie. Cellen vertalen voortdurend informatie uit de omgeving en nemen beslissingen om al dan niet te groeien, te specialiseren of te afsterven. Ook kunnen ze elkaar en andere cellen in hun omgeving beïnvloeden door middel van afgifte van eiwitten en eiwitten verpakt in blaasjes. Vaak zijn meerdere signalen nodig om celgedrag te beïnvloeden en verschillende combinaties kunnen complexe celresponsen reguleren via verandering in de expressie van genen in het DNA, de dragers van de erfelijke informatie.

Binnenin de cel worden de verschillende biologische processen gereguleerd door nauw verweven eiwitnetwerken die routes voor signaaloverdracht vormen. In deze netwerken is een centrale rol weggelegd voor kinases. Dit zijn eiwitten die andere eiwitten van één of meer fosfaatgroepen voorzien (fosforyleren) en daardoor hun activiteit, subcellulaire lokatie en/of voortbestaan beïnvloeden. Als bepaalde kinases door uiteenlopende oorzaken afwijkende activiteit vertonen, veroorzaken ze een abnormaal niveau en/of patroon aan fosfoeiwitten, met ontspoorde signalering en de ontwikkeling en progressie van kanker tot gevolg.

Translationele OncoProteomics: over vertalen van (fosfo)eiwit fingerprints



Kankercellen hebben dus een ongewone 'fosfoeiwit fingerprint' als handtekening. Onze uitdaging is om de eiwittaal van kankercellen te ontcijferen. Hierbij maken we gebruik van massaspectrometrie data en de DNA code.

Met de invulling van mijn leerstoel translationele oncoproteomics, hoop ik grootschalige analyse van

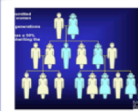
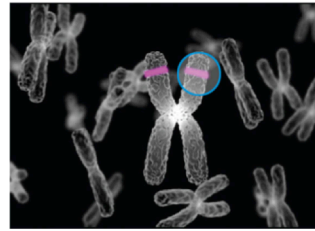
fosfoeiwit fingerprints in cellen en weefsels te vertalen naar nieuwe kennis over tumorbiologie en verbeterde diagnostiek en behandeling van kanker. **Dit is in een nutshell waar de leerstoel "Translationele OncoProteomics" over gaat.**

II Wat is kanker ?

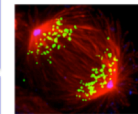
Kanker is niet één ziekte maar een verzameling van ziektes die gekarakteriseerd worden door ongecontroleerde groei van cellen. Het ontstaan en de ontwikkeling van een tumor wordt veroorzaakt door veranderingen in het DNA, mutaties genaamd, die zich ophopen in cellen in de tijd. Sommige mutaties zijn

geerfd van de ouders en zijn aanwezig in iedere lichaamscel. Echter, de meeste mutaties in het erfelijk materiaal worden verkregen tijdens het leven. Deze mutaties ontstaan bijvoorbeeld tijdens de celdeling. Het aantal keren dat een cel deelt, verhoogt de kans dat deze cel een mutatie verkrijgt. Weer andere mutaties worden verkregen door het blootstaan aan omgevingsfactoren die schade toebrengen aan het DNA, zoals UV stralen van de zon, uitlaatgassen en tabaksrook. Kanker wordt dus veroorzaakt door de ophoping van mutaties in de tijd. Dit betekent dat des te ouder een persoon wordt, des te waarschijnlijker het is dat hij of zij een combinatie van mutaties heeft die een cel carcinogeen kunnen maken. Daarom komt kanker bij oudere mensen vaker voor.

Accumulatie van mutaties in het genetische materiaal



Erfelijke mutaties



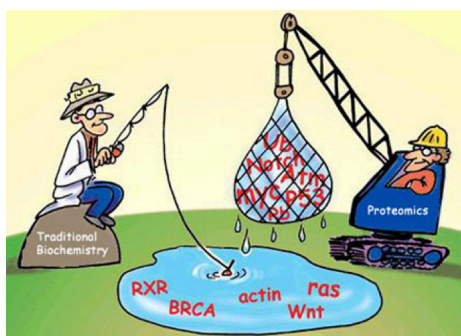
Mutaties tijdens celdeling



Mutaties door omgevingsfactoren

	Increasing time & number of mutations			
Precancerous stage Dysplasia Carcinoma <i>in situ</i>	Stage I Localized	Stage II Early Locally advanced	Stage II Late Locally advanced	Stage IV Metastasized
Preventive screening	Early detection		Detection for intervention	
Removal abnorm. tissue	Surgical intervention			
	Therapeutic radiation			
Therapeutics	Therapeutics			

Het progressieve karakter van kanker geeft ons de kans om medische interventies te doen die gericht zijn op kanker voorkomen, de ziekte vroeg te detecteren of de tumor te behandelen, middels operatie, bestraling of therapeutica. Omdat naarmate een tumor groeit, niet alle tumorcellen dezelfde sets aan mutaties hebben, is het niet eenvoudig een tumor te behandelen en zijn waarschijnlijk slimme combinaties van therapie nodig. Hoe meer we weten over het samenspel van de factoren die tumor-biologie en -ontwikkeling beïnvloeden, des te precieser we kanker kunnen voorkomen en behandelen.

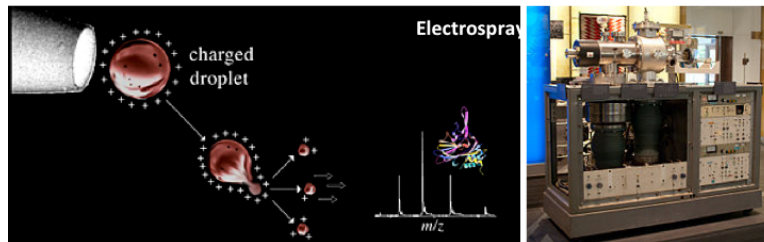


In ons onderzoek focussen we op de elwitten dus op de functionele cel machinerie, waar medicatie op aangrijpt.

We kijken hierbij niet naar enkele eiwitten, maar we bestuderen zoveel mogelijk eiwitten tegelijk. Het veld dat zich met grootschalig eiwitonderzoek bezighoudt wordt aangeduid met de term “proteomics”

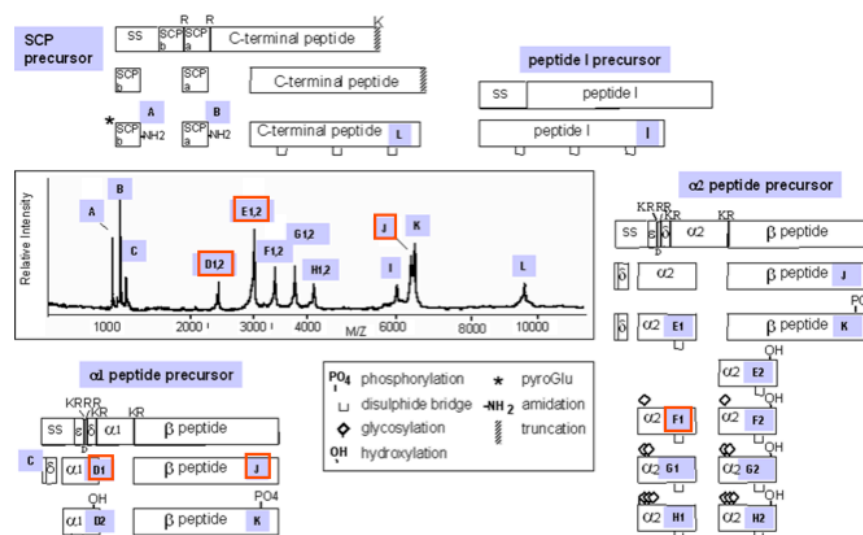
III. Proteomics in historisch perspectief

Het woord “proteïne” of eiwit was geïntroduceerd in 1938 door de Zweedse chemicus Berzelius. Hiermee beschreef hij een bepaalde klasse van macromoleculen die veelvuldig voorkomen in levende wezens en die gemaakt zijn van lineaire ketens van aminozuren. De eerste biochemische studies die voorlopers van proteomics-onderzoek waren, stammen uit 1975. De introductie van twee-dimensionele gel electroforese maakte grootschalige scheiding en visualisatie van eiwitten mogelijk. Echter er waren toen nog geen technieken voor grootschalige eiwit identificatie voorhanden.



Eiwitonderzoek kwam in een stroomversnelling in 1987 met de ontdekking van zachte ionisatie methodes die eiwitanalyse middels massaspectrometrie mogelijk maakten. Met electrospray ionisatie en laser desorptie ionisatie konden voor het eerst eiwitten geladen in de gasfase gebracht worden, zonder dat ze kapot gingen. Een ontdekking waarvoor in 2003 de Nobelprijs chemie uitgereikt is.

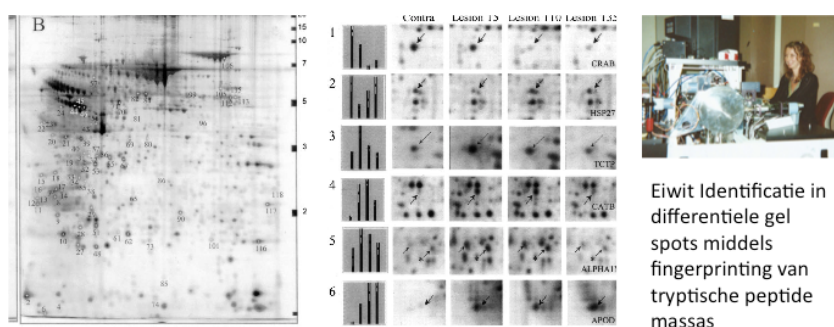
In 1990 werd ik als stagestudent bij Dr. Ka Wan Li gegrepen door het onderzoek naar het functioneren van zenuwcellen met eiwitchemische technieken, hetgeen resulteerde in een promotieonderzoek bij Ka Wan en Prof. Wijnand Geraerts 2 jaar later. Het was een spannend project waarbij de opdracht was om met de nieuwe massaspectrometrie neuropeptidenprofielen in individuele zenuwcellen in kaart te brengen en te koppelen aan celfunctie. Het onderzoek deden we in samenwerking met Peter van Veelen bij wie we op de 1e MALDI-massaspectrometer in Nederland konden meten en met Klaus Dreisewerd in het biofysica lab in Munster van professor Hillenkamp. Al vrij snel, in 1992, lukte het om neuropeptidenprofielen in kaart te brengen van de cardiovasculaire zenuwcel VD1 in de poelslak Lymnaea.



Hier ziet U het peptidemassaprofiel van VD1. We vonden niet alleen de toen bekende neuropeptiden aan de hand van hun preciese massa of molekuulgewicht, met de rode vierkanten aangeduid, maar ook een flink aantal nieuwe kandidaatpeptiden. Dit was peptidomics “avant la letre” en een doorbraak in het biochemie veld, dat zich toen vooral bezig hield met de analyse van grote hoeveelheid gesynthetiseerd eiwit uit een flesje. Mijn fascinatie voor massaspectrometrie is toen geboren en de creatieve toepassing daarvan loopt als een rode draad door mijn wetenschappelijke carrière heen. Echter de massaspectrometers van toen, konden alleen massas meten, dus identificatie van de onbekende kandidaatpeptides moest via de klassieke manier met chromatografische zuivering, Edman sequencing en cloneren plaatsvinden, hetgeen minstens 2 jaar heeft gekost van mijn promotieonderzoek. Met de machines van nu zou de sequentie analyse slechts enkele uren tot dagen gekost hebben!

Genomics enables MS-based proteomics

De termen “proteoom” and “proteomics” werden bedacht in 1997 door Marc Wilkins, als een afspiegeling van de termen “genomics” en het “genoom”, dat de gehele verzameling van genen in een organisme representeert.



Tijdens mijn post-doc eind jaren 90 aan de University of California in San Francisco, heb ik in het massaspectrometrie lab van Prof. Al Burlingame gewerkt. Daar leerde ik de 2D gel electrophoresis techniek gebruiken die in de eerste fase van het proteomics onderzoek essentieel was om de complexe eiwitmonsters te scheiden. Ook maakte ik daar gebruik van in het lab ontwikkelde bioinformatica tools om eiwitten te identificeren aan de hand van enzymatische eiwit fingerprints. Het hele veld was toen nog in ontwikkeling en het was een voorrecht om in een vooraanstaande laboratorium de kneepjes van het vak te leren.

2001

2014

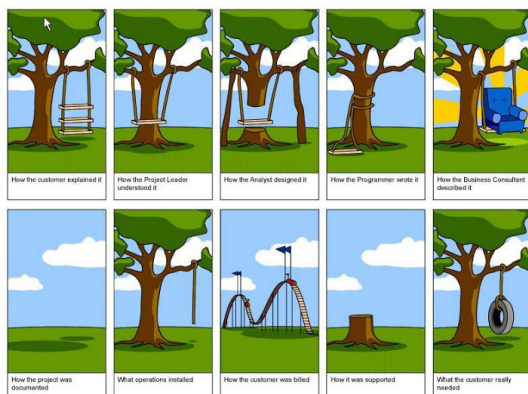


In diezelfde jaren 90, leverde het Humane Genoom Project een belangrijke bijdrage aan de biologie door het ontcijferen van de referentie sequentie van het humane genoom. De eerste versies van de sequentie werd gepubliceerd in 2001 in de tijdschriften Nature en Science. Alles bij elkaar had die klus dertien jaar geduurd en 2,7 miljard dollar gekost. Dit project illustreert de kracht en succes van een grote, geïntegreerde, cross-disciplinaire inspanning –oftewel 'big science'. En ook niet onbelangrijk, deze inspanning leidde tot de ontwikkeling van nieuwe technologieën en stimuleerde een open benadering van het delen van data en software. Hierdoor werden de data en analyse tools beschikbaar voor iedereen. Het Humane Genoom Project heeft het gebruik van massaspectrometrie gekatalyseerd, door een referentie sequentie te leveren en daarmee de voorspelde massas van alle tryptische peptides in het humane proteoom - een essentiële voorwaarde voor de analyse van proteomics data.

Sindsdien zijn er snelle ontwikkelingen geweest in massaspectrometrie apparatuur en de bioinformatica tools om eiwitten te identificeren en kwantificeren, hetgeen resulteerde in de publicatie van de draft human proteome in 2014. De gerapporteerde data in 2014 bevatten ongeveer 90% van de eiwit-encoderende genen. De belangrijkste bevinding was dat het proteoom meer complex was dan gedacht. Er waren namelijk allerlei nieuwe eiwit coderende sequenties gevonden waaronder vertaalde pseudogenes, lncRNAs en nieuwe coderende exonen.

III. (Onco)Proteomics experiment, hoe werkt het?

Vertalen: Multidisciplinaire samenwerking (elkaars taal leren spreken)



Ons Translationele OncoProteomics onderzoek wordt uitgevoerd door een multidisciplinair team, bestaande uit biologen, biochemici, klinici en data analyse mensen met expertise in bioinformatica, statistiek, en computer science die allemaal een stukje van de puzzel bijdragen. Echter als we niet oppassen kan zo'n samenwerking al snel een babelonische spraakverwarring opleveren, zoals in deze dia ludiek weergegeven is met de verschillende interpretaties van hetzelfde project. Het is dus belangrijk dat er veel contact is om te zorgen dat de communicatie goed verloopt. Wanneer je lang samenwerkt lukt dat gelukkig steeds beter en leren we tot op zekere hoogte ook elkaars taal spreken.

Current team

Core group

Connie Jimenez head

Sander Piersma LC-MS/MS

Jaco Knol Bioinformatics LC-MS/MS

Thang Pham informatic

From start in 2006

Clinical members

Henk Verheul, Mariette Labots

Wet/dry lab support

PhD students

with Hema dept.

Alliantie AIO

with Clin Gen dept.

with NKI

Post-Docs

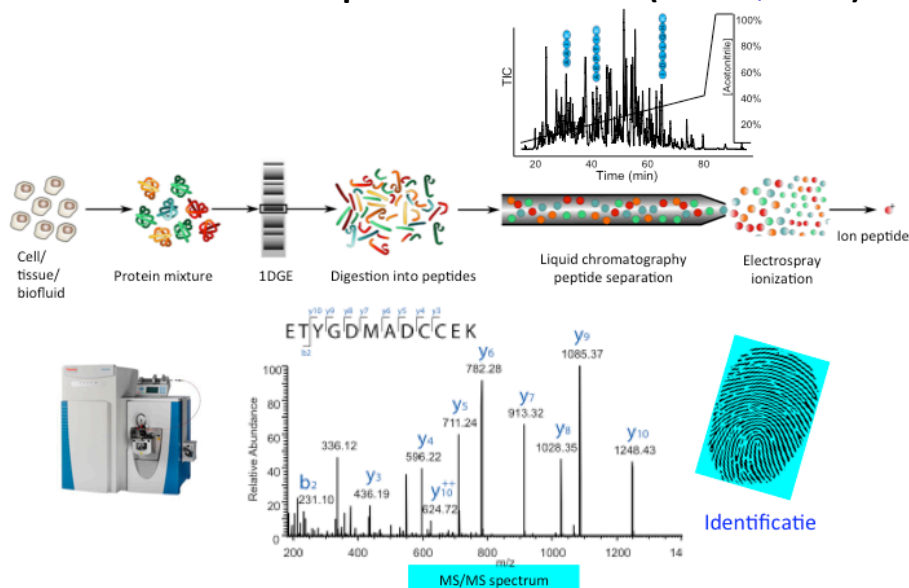
with NKI

with NKI



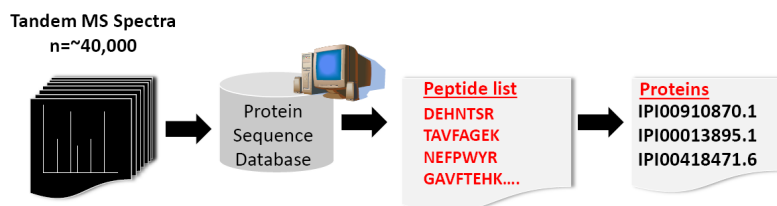
In deze dia ziet U fotos van de huidige OncoProteomics teamleden die al die verschillende disciplines vertegenwoordigen. In het bijzonder zou ik willen noemen: Dr. Sander Piersma, biochemicus en massaspectrometrist die alles uit de instrumenten weet te halen, Dr. Jaco Knol, moleculair bioloog die inmiddels ook omgeschoold is tot volwaardig bioinformaticus, en Dr. Thang Pham, computer scientist, die cruciaal is voor de analyse van onze big data. Hun high-tech ondersteuning is key om alle mooie projecten van de AIOs en post-docs mogelijk te maken. Ik ben erg blij en dankbaar dat ik zo'n fantastisch team heb, al 10 jaar lang.

Vertalen: Van MSMS spectrum naar eiwit (ID & QUANT)



Om te begrijpen waar ons translationele oncoproteomics onderzoek over gaat, zal ik U eerst de basics uitleggen van een proteomics experiment. Een proteomics experiment start met het biologische monster en daarom is de eerste stap het extraheren van eiwitten uit de biologische matrix. De eiwitten worden vervolgens gescheiden met gel electrophoresis en per gel band in kleinere stukken geknipt met trypsine. De peptide mengels worden gescheiden met nano-vloeistof chromatographie en geanalyseerd met massaspectrometrie. In de massaspectrometer worden iedere seconde de top 10-20 peptides die van de kolom elueren gefragmenteerd in een botsingskamer hetgeen resulteert in een MS/MS

spectrum voor ieder peptide. Aan de hand van de gemeten massas van de peptidenfragmenten kan de sequentie bepaald worden.

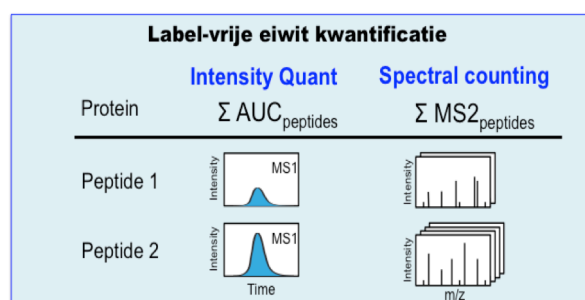


In een typisch proteomics experiment worden miljoenen MS/MS spectra gegenereerd en gebruikt om eiwitsequentie databases te doorzoeken. De huidige bioinformatica tools maken vol-automatisch eiwitidentificatie via in silico matching van voorspelde massas met gemeten massas.

Het is van belang hierbij op te merken dat er geen amplificatietechniek voor eiwitten is, dus fractioneren van het complexe eiwitmengsel uit een cel of weefsel is essentieel voor een goede proteoom analyse. Onze favoriete workflow voor het bepalen van eiwitexpressie fingerprints maakt gebruik van eiwitscheiding in een polyacrylamide gel als voorzuivering. Dat werkt zeer goed, ook als je het vergelijkt met -onder analytisch chemici- populaire methodes gebaseerd op chromatografie en maakt een eenvoudige visuele check van globale kwaliteit van de monsters mogelijk. Ons methodische werk op dat terrein is door Sander Piersma gepubliceerd in 2010 in de Journal of Proteome Research. Dit artikel kreeg speciale aandacht met een apart artikel.

Het kwantificeren van eiwitten aan de hand van massaspectrometrie data kan met behulp van stabiele isotoop labeling of label-vrij. Labelvrij is te verkiezen wanneer men grote series klinische monsters wil meten. Wij zijn pionier op het doen van label-vrije massaspectrometrie analyses en

we hebben in meerdere artikelen het success van deze aanpak laten zien, zo ook in het artikel dat ik net al aanhaalde. Thang Pham in mijn groep heeft voor de spectral count data de bijbehorende statistiek ontwikkeld.



Vertalen: DATA → KENNIS (STATS, BIOINFORMATICS, DATA INTERPRETATIE)

Wanneer we de proteoom data hebben, begint de volgende uitdaging: data analyse en data interpretatie die nodig is om kanker-geassocieerde eiwitten te vertalen naar functie en aberrante functie. In deze dia ziet U een stukje van een data-file die duizenden regels bevat en tientallen kolommen. U begrijpt dat we niet zomaar met het blote oog en domeinkennis van de biologie hier alle biomarkers en drug targets uit kunnen halen.



Wat we namelijk willen is alle relevante eiwitten uit de data halen, niet alleen de eiwitten die al bekend waren. Hoe ik dit bedoel is te zien in dit plaatje waarbij de opdracht is: zoek de tijgers in deze afbeelding. U ziet waarschijnlijk meteen de 2 grote en de 2 kleine tijgers. En als U langer en beter kijkt, zult U waarschijnlijk zien dat er nog veel meer tijgers in de afbeelding verborgen zijn.

Wat wij in onze data analyse doen is op verschillende manieren naar de data kijken zodat we een zo compleet mogelijk beeld kunnen krijgen van de tumorbiologie en daarmee *alle* potentiële biomarkers en drug targets.

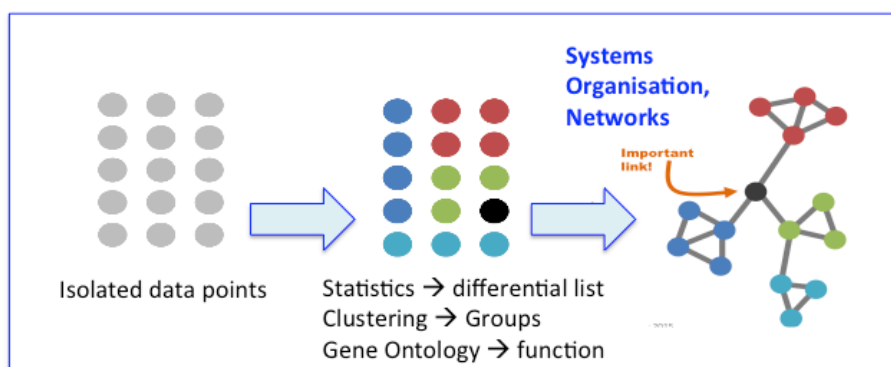


Figure adapted from BioSB 2015 course: Biological Network Analysis, 2015

Om een goede, onbevooroordeelde data interpretatie mogelijk te maken, maken we gebruik van statistische, computer science en bioinformatica methodieken. Losse datapunten die quantitative eiwitinformatie bevatten, groeperen we via statistiek en cluster analyses op manieren die functioneel inzicht geven in de data. Visualizatie als eiwit interactienetwerken is hierbij belangrijk. U zult intuïtief al begrijpen dat een centraal gelegen eiwit wel eens een goede drug target zou kunnen zijn, omdat wanneer een centraal gelegen eiwit geblokkeerd wordt, de interactors mogelijk ook beïnvloed en gehinibieerd worden.

Tot zover mijn uitleg over proteomics.

IV. Translationele OncoProteomics

Wat zijn de uitdagingen in het kankeronderzoek en in de kliniek en hoe kan proteomics hier een bijdrage aan leveren?

Het kankeronderzoek in de afgelopen jaren heeft zich gericht op 2 speerpunten: Het zoeken naar ge-dereguleerde genen in humane tumor monsters en het screenen voor genen die in staat zijn een cel te transformeren tot kankercel in experimentele modelsystemen.

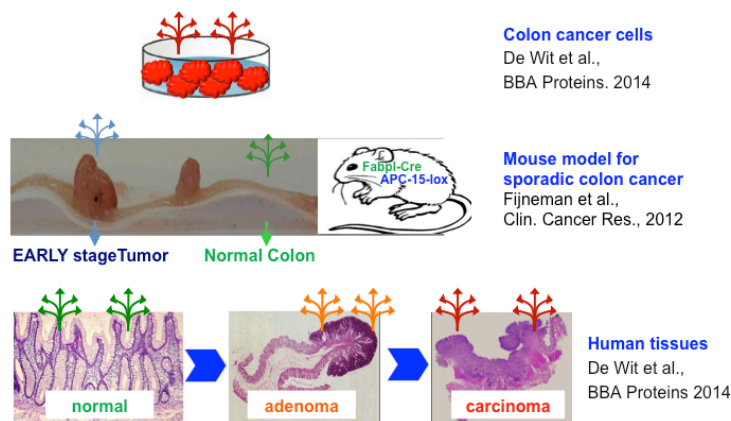
Hallmarks of cancer (Hanahan & Weinberg, Cell 2011)



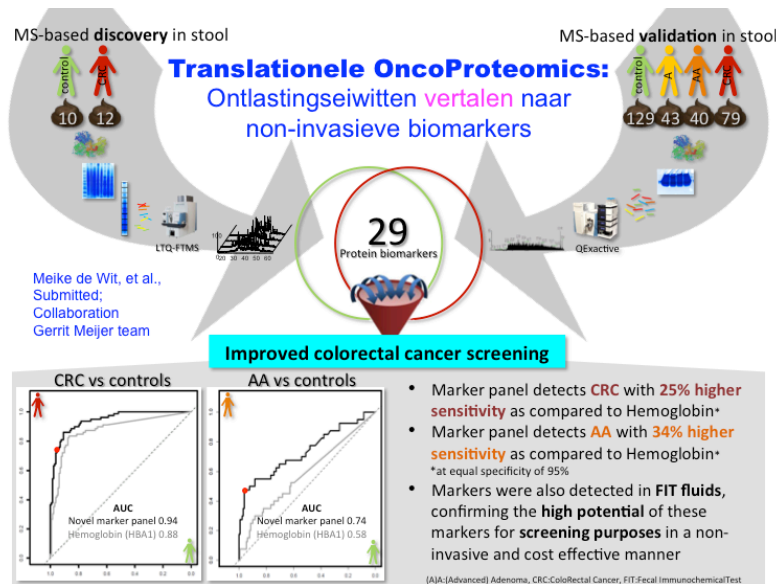
Op dit moment zijn enkele honderden genen geklassificeerd als oncogen of tumor suppressor. Functionele studies hebben aangetoond dat deze genen een integrale rol spelen in cel-groei, -dood, overleving, response op stress, beweeglijkheid, differentiatie, crosstalk tussen cellen, and weefsel opbouw. Kanker ontstaat dus door een dysregulatie van normale cellulaire processen. De kennis over oncogenen is niet alleen belangrijk voor het ontcijferen van cellulaire en moleculaire mechanisms die een rol spelen bij tumorvorming, maar ook voor het behandelen van patiënten met kanker met middelen die zulke genen en hun signaleringroutes kunnen blokkeren. Dat noemen we gerichte therapie. Eveneens van belang is het om diagnostische benaderingen op basis van moleculaire biomarkers te ontwikkelen om deze afwijkingen te herkennen en te voorspellen wie zal reageren op de behandeling.

Voorbeelden Translational OncoProteomics biomarker onderzoek OPL:

In de komende paar minuten zal ik U vertellen over ons Translationele OncoProteomics onderzoek in de biomarker context.



Extracellulaire eiwitten die uitgescheiden worden door kankercellen zijn daarbij interessant omdat die relatief eenvoudig te vertalen zullen zijn naar non-invasieve biomarkers en diagnostische tests met lichaamsvloeistoffen die eenvoudig te verkrijgen zijn zoals bloed, urine of ontlasting. Ons onderzoek naar eiwitten gesecreteerd door darmkanker cell lijnen, darmtumoren uit een muizenmodel, en humane tumoren heeft ons een schat aan kandidaat biomarkers opgeleverd. Om te spreken met de woorden van mijn samenwerkingspartner Remond Fijneman: “Wow in een enkel secretoom experiment herontdekken we tientallen jaren tumor biologie en nieuwe biomarkers!” Dit werk hebben we o.a. in het tijdschrift Clinical Cancer Research in 2012 gepubliceerd.



Voor de vroege detectie van darmkanker is de ontlasting het klinisch meeste relevante monster om te bestuderen, omdat deze lichaamstof gebruikt wordt voor de huidige screeningstest in het bevolkingsonderzoek naar darmkanker. Die test onderzoekt of het bloedeiwit hemoglobine aanwezig is in de ontlasting. Onderzoek uitgevoerd door toen promovendus, nu post-doc Meike de Wit, in samenwerking met het team van Gerrit Meijer heeft zich de afgelopen jaren gericht op het vinden en valideren van eiwitbiomarkers in de ontlasting waarmee we de huidige screeningstest voor darmkanker kunnen verbeteren. In dit onderzoek zijn een aantal veelbelovende eiwitmarkers geïdentificeerd en gevalideerd in een cohort van 300 patiënten. Een selectie van deze markers wordt nu verder ontwikkeld in het SU2C dreamteam van Gerrit Meijer. Op dit moment lopen er ook 2 KWF projecten met Remond Fijneman, Beatriz Carvalho en Gerrit Meijer op het terrein van alternatieve splicing en eiwitsignalering in de ontwikkeling van darmkanker, ook projecten waar ik veel van verwacht.

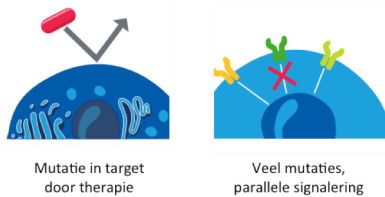
Een ander project richt zich op de heterogeniteit van darmtumoren want darmkanker vertegenwoordigt niet 1 ziekte, maar minstens 4 verschillende ziektes, zo is gebleken uit grootschalig RNA onderzoek van o.a. onze collega Jan Paul Medema op het AMC. Samen met hem, en als onderdeel van een Alpes d'H6 KWF project, richten we ons daarom ook op het vinden van biomarkers voor darmkanker subtypes, waarvan de patiënten verschillende overleving laten zien. Ook in dit project zijn eiwitbiomarkers geïdentificeerd en gevalideerd in een externe publieke dataset en in een serie darmtumoren van het ErasmusMC. We hopen dat we deze markers verder kunnen ontwikkelen in de tweede, klinische fase van het project wat recentelijk bij KWF is ingediend.

Tot zover ons eigen onderzoek. In de komende minuten richt ik mij op de uitdagingen bij de behandeling van kanker met gerichte therapie.



Uitdagingen in de behandeling van kanker met gerichte therapie

Het concept van gerichte therapie van kanker kwam tot bloei in 1996 met de ontwikkeling van de remmer imatinib voor de behandeling van chronische myelogene leukemia. Deze vorm van leukemie wordt gekarakteriseerd door de aanwezigheid van een unieke chromosomale translocatie, die resulteert in de productie van het fusie-eiwit BCR-ABL in leukemie cellen. Imatinib bindt en inhibeert het ABL kinase deel. En met imatinib therapie, krijgen meer dan 90% van de patiënten remissie van de ziekte. Het succes verhaal van imatinib gaf een impuls aan de veld van kankeronderzoek om moleculaire targets en effectieve gerichte therapie te ontwikkelen. Inmiddels zijn er nu tientallen gerichte therapeutica in gebruik voor de behandeling van kanker, en zijn er nog veel meer in klinische ontwikkeling.



Helaas is het toepassen van moleculaire gerichte therapie toch niet eenvoudig in de meeste gevallen omdat slechts weining tumoren een unieke kanker-specifieke afwijking hebben zoals het BCR-ABL fusie eiwit. En onder invloed van therapie kunnen nieuwe mutaties ontstaan waardoor de tumor ongevoelig wordt voor de

behandeling.

Genomics heeft laten zien dat iedere tumor tientallen tot honderden mutaties kan bevatten die de eiwitproducten beïnvloeden. In deze zee van gedereguleerde genen is het niet eenvoudig om de therapie target te onderscheiden. Bovendien is het hebben van een aberrante target geen garantie op therapeutisch succes, omdat er redundantie is in de signalerings-netwerken die celproliferatie aansturen en die de kankercel resistent kunnen maken tegen een behandeling voor een enkele drug target. Het is dus van belang om inzicht te hebben in de activatiestaat van de complete eiwitmachinerie van een tumor om de juiste medicatie of combinatie therapie te kunnen selecteren.

Translationele OncoProteomics in de context van “therapie-op-maat”

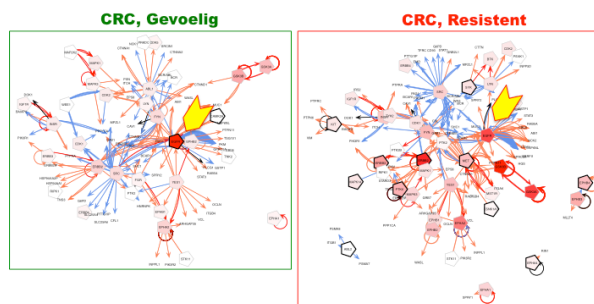
We weten nu dus veel over hoe kanker werkt, dat iedere tumor uniek is en dat therapie resistentie een veelvoorkomend fenomeen is in kanker. Echter de artsen kiezen nog steeds een behandeling die voor de meeste mensen met een bepaald tumortype werkt, en doorgaans niet is afgestemd op de individuele patiënt. Ons Translationele OncoProteomics onderzoek in samenwerking met het afdelingshoofd Henk Verheul, probeert hier verandering in te brengen. Hiertoe participeren wij ook in de het nationale Center for Personalized Cancer Treatment.

Vertalen: Van fosfoeiwit fingerprint naar therapie-op-maat

Omdat kinase activiteit vaak ontregeld is in kankercellen zijn er gerichte anti-kanker medicijnen ontwikkeld die de functie van kinases kunnen blokkeren. Echter zoals ik net besprak, is de selectie van de juiste patient voor de juiste therapie niet eenvoudig. Door de geactiveerde eiwitten in het fosfoproteoom van een tumor in kaart te brengen met massaspectrometrie, hopen we in de toekomst aan elke patiënt een behandeling op maat te bieden. Hiertoe hebben we de afgelopen jaren veel geïnvesteerd in een robuuste workflow voor het invangen en meten van fosfopeptiden.

Ook heeft Mariette Labots, oncoloog en promovendus, de methode geminiaturiseerd om de analyse van kleine klinische monsters zoals een tumor naaldbiopt mogelijk te maken. In meerdere klinische studies van de afdeling medische oncologie, gecoördineerd door Henk Verheul, worden naaldbiopten voor en tijdens behandeling afgenomen bij patiënten. In de nabije toekomst kunnen we hiermee de waarde van fosfoproteomics in de oncologische setting van gerichte therapie bepalen. Ook ben ik geïnteresseerd om in de toekomst de waarde na te gaan bij andere vormen van kankertherapie zoals de veelbelovende immunotherapie.

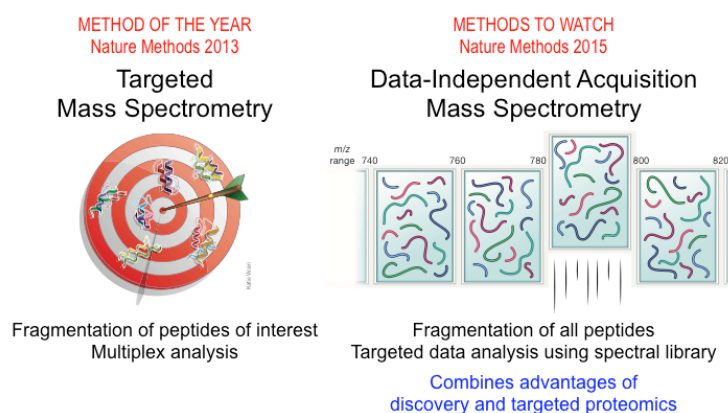
Omdat patiënten niet met heel veel anti-kanker middelen tegelijk behandeld kunnen worden richt onze data analyse zich op het onderscheiden van de meest belangrijke, “Achilles hiel” fosfoeiwitten in de tumor. Hiertoe hebben we een unieke data analyse strategie ontwikkeld die 4 verschillende fosfoeiwit data types combineert waarmee via een algoritme kinase activiteit kunnen prioriteren of ranken en visualiseren. We hebben de analyse getest op meerdere kankercellijn modellen en mens-in-muis tumormodellen.



Deze dia toont U een data analyse en visualisatie voorbeeld van promovendus Robin Beekhof in mijn groep, die onderzoek doet naar nieuwe drug targets en predictieve biomarkers in darmkanker. In deze plaatjes zijn de top 20 kinase activiteiten gevisualiseerd als fosfokinase-substraat network in een darmtumor die gevoelig is voor anti-EGFR therapie en een darmtumor die resistent is. Deze network weergave geeft inzicht waarom de ene tumor wel gevoelig is en de andere niet: de gevoelige tumor heeft alleen fosfo-EGFR als hyperactief centraal gelegen fosfokinase, terwijl de resistente tumor een veel complexer network laat zien met meerdere hyperactieve fosfokinases, die voor escape routes zorgen. De voorspelling is dat een combinatie van kinaseremmers gericht tegen enkele andere hyperactieve kinases in dit network wel voor remming van de groei van deze tumor zou kunnen zorgen. Deze hypothese zullen we binnenkort testen in mens-in-muis tumormodellen in het laboratorium van Livio Trusolino in het Candiolo instituut in Turijn.

Vertalen: (Fosfo)eiwit fingerprint naar klinische toepassing (precisie, throughput)

High throughput, high sensitivity, quantitative accuracy and reproducibility



Fosfoproteomics geeft dus direct inzicht in geactiveerde kinases en signalerings routes. Om fosfoproteomics op een robuuste manier in de klinische praktijk te implementeren hebben we een snelle, gevoelige, accurate en reproduceerbare meetmethode nodig. Hiertoe hebben we twee massaspectrometrie opties. De eerste is gerichte massaspectrometrie, een krachtige manier om selectief enkele tientallen eiwitten in een antilichaam-vrije, multiplex analyse, zeer nauwkeurig en gevoelig te meten. Een tweede, nieuwe meetstrategie is “data-onafhankelijke acquisitie” massaspectrometrie. Deze nieuwe manier van massaspectrometrie combineert de kracht van discovery proteomics met de kracht van gerichte massaspectrometrie. In deze strategie worden alle peptides in een bepaald massa-window gefragmenteerd en de analyse wordt herhaald totdat het hele massabereik gemeten is. Het resultaat is een globale en accurate peptide quantificatie zonder de beperking van het kiezen van een subset van de peptides. Deze unieke benadering zal essentieel zal zijn voor vertaling van fosfoproteomics naar de kliniek. Hiertoe hebben we recentelijk een nieuwe supersnelle massaspectrometer kunnen aanschaffen met steun van NWO-Middelgroot en de VUmc-Cancer Center Amsterdam. Ik ben vereerd dat Prof. Ruedi Aebersold die pionier is op deze vorm van massaspectrometrie, nu hier aanwezig is, en eerder een fantastische lezing gaf op het oratiesymposium.

Tot slot, samenvattend, ik verwacht dat translationele OncoProteomics data in de toekomst de sleutel zullen vormen bij de vertaling van nieuwe inzichten in tumorbiologie naar meer preciese diagnostiek en behandeling van kanker. Ik voorzie dat een compleet begrip van kanker, gebaseerd op integratie van (fosfo)proteomics met genomics, en krachtige data analyse tools en slimme databases, essentieel zullen zijn om vooruitgang te boeken en precisie geneeskunde tot realiteit te maken.

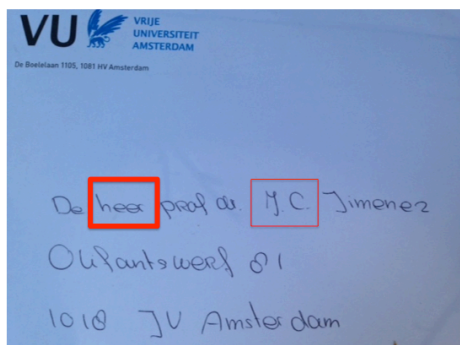
Toekomst: Translationele OncoProteomics in Multi-Omics Context voor Precisie Geneeskunde

- (Phospho)proteomics
- Integratie met genomics, klinische & experimentele data
- Computationale systems medicine tools



Om dit alles verder mogelijk te maken, is substantiele en voorspelbare financiering van instituut en van subsidiegevers essentieel. Ik zou willen bepleiten dat translationeel onderzoek cruciaal is voor de patient van morgen, en dat dit werk passende aandacht en ondersteuning vereist van een academisch ziekenhuis. Alleen door te investeren in onderzoekstalent, tools en infrastructuur en met betrokkenheid van klinici en patient, zullen we in staat zijn om de vooruitgang te versnellen en ons doel te realiseren om kanker te voorkomen en genezen.

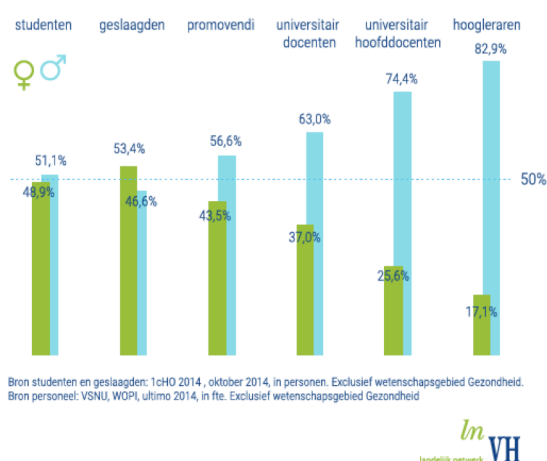
V. Miscellaneous



Tot slot, het beeld dat veel mensen van een professor hebben, is het beeld van een man. De

benoemingsbrief van de VU was abusievelijk gericht aan de heer Jimenez. Het beeld dat een Prof een man is klopt meestal ook want in Nederland, anno 2016, is slechts ~17% van de hoogleraren vrouw. Waarom dit aantal zo laag is weet niemand precies, en het voert te ver om nu daarop in te gaan. Ik hoop dat ik met mijn benoeming tot hoogleraar een rolmodel zal zijn voor de nieuwe generatie vrouwelijke wetenschappers om door te stoten naar de top, zodat er een meer evenwichtige afspiegeling komt van de workforce en op termijn dit soort denkfouten ook niet meer gemaakt worden.

Percentage vrouwen, van student tot hoogleraar



V. Dankwoord

Ik sta hier mede dankzij de inspanningen van vele mensen.

Allereerst wil ik het College van Bestuur van de VU en de leden van de Raad van Bestuur van VUmc bedanken voor het in mij gestelde vertrouwen.

Ik dank het hoofd van de afdeling Medische Oncologie, Henk Verheul, voor het steunen van deze leerstoel. Zijn steun is ook essentieel bij het verder ontwikkelen van fosfoproteomics naar de kliniek en ik ben blij met de vruchtbare samenwerking.

Binnen het onderzoeksinstituut CCA ben ik verder speciale dank verschuldigd aan Prof. Bob Pinedo die mij in 2006 de kans gaf om het OncoProteomics lab op het VUmc-CCA vorm te geven en te gaan leiden. Ook dank ik Ruud Brakenhof en Angelika Drager voor hun rol in de plannenfase voor 2006 en hun participatie in de Programma Advies Commissie in de beginjaren van het OPL.

Dank aan de mensen die belangrijk zijn geweest voor mijn wetenschappelijke ontwikkeling, ik zal ik ze kort chronologisch noemen: Wijnand Geraerts, mijn promotor op de VU, die mij leerde om kritisch na te denken en perfectie na te streven; Ka Wan Li, mijn stagebegeleider en co-promotor van wie ik vreselijk veel geleerd heb. Sinds mijn AIO project is massaspectrometrie voor ons allebei de favoriete tool. Ik ben heel blij dat je je werkbezoek in China onderbroken hebt om hier nu aanwezig te kunnen zijn; Al Burlingame in wiens lab in San Francisco ik mij verder heb kunnen specialiseren in massaspectrometrie en proteomics, en waar ik ook gezien heb hoe je een mass spec resource runt; Guus Smit die mij tijdens mijn 2e postdoc periode weer terug in Nederland op de VU, de ruimte gaf om een nieuwe richting op te gaan met proteomics. Ook heel fijn dat dit wetenschappelijke nest niet ver weg is. Het campus-brede proteomics overleg dat we af en toe houden met de groep van Ka Wan is altijd erg nuttig.

Dank aan alle collegas uit de vele stimulerende samenwerkingsprojecten waar ik continu veel van leer:

- In de pionieringsfase, zelfs voor het OPL en het CCA bestonden, waren dat Klaas Hoekman, Frank Kruyt, Henk Broxterman en Beppe Giaccone. En met Henk Broxterman hebben we de eerste fosfoeiwitprofielen gegenereerd.
- Op darmkanker, ook van het eerste uur: Remond Fijneman, Beatriz Carvalho, en Gerrit Meijer, en verder Onno Kranenburg, Jan Paul Medema en de partners van het nationale Connection consortium. En mijn Vanderbilt collaborator op darmkanker, Rob Slebos, die speciaal overgekomen is uit de VS.

Verder dank ik mijn samenwerkingspartners:

- Op leukemie met Sonja Zweegman, Jacqueline Cloos, Jeroen Janssen, en Linda Smit
- Op prostaatkanker met Irene Bijnsdorp en Guido Jenster en de partners van het landelijke Improve consortium.
- Op borstkanker met Jos Jonkers, Sven Rottenberg, Petra van der Groep, Paul van Diest en Epie Boven
- Op longkanker met Egbert Smit, Sjaak Burgers, Ton Berns en Erik Thunissen
- Op pancreas kanker, een VUmc-AMC alliantieproject met Elisa Giovanetti, Maarten Bijlsma, Geert Kazemier en Hanne van Laarhoven
- Op een genetische vorm van nierkanker met Rob Wolthuis
- Op zuurstofradikalen met Josefine Dorsman
- Op EBV en exosomen met Jaap Middeldorp en Michiel Pegtel
- Op hersenziektes en dementias, onderzoek van het 1e uur met Charlotte Teunissen, Wilma van den Berg en Philip Scheltens en recentelijk met Ronald van Kesteren
- Op mycobacterien, met Edith Houben en Wilbert Bitter

Dank aan de collegas van de afdeling Medische Oncologie, voor alle gezelligheid, nuttige discussies en waardevolle input op de brainstorm avonden.

Veel dank ben ik verschuldigd aan het OPL team, leden uit voorgaande jaren en nu, vandaag sta ik op hun schouders, dank jullie wel voor al het mooie werk en de fijne sfeer waarin iedereen met elkaar kennis en tools deelt.

En mijn thuisbasis, Pablo en Jaime, jullie inventiviteit en creativiteit, en soms ook eigenwijsheid verbazen me elke dag. Ik ben benieuwd wat jullie pad wordt, ik hoop dat jullie het zullen vinden zoals ik het mijne gevonden heb.

Alex, het zal niet altijd makkelijk zijn om een gepassioneerde onderzoeker als partner te hebben. Al meer dan de helft van ons leven zijn we samen. Dank voor je zorgzaamheid, de ruimte die je me geeft en liefde.