



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Enhancing reovirus for use in oncolytic virotherapy

Kemp, V.

Citation

Kemp, V. (2019, February 7). *Enhancing reovirus for use in oncolytic virotherapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/68327>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/68327>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:

<http://hdl.handle.net/1887/68327>

Author: Kemp, V.

Title: Enhancing reovirus for use in oncolytic virotherapy

Issue Date: 2019-02-07

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Oncolytische virussen zijn bijzonder. Ze onderscheiden kankercellen van normale, gezonde cellen. Alleen kankercellen kunnen worden geïnfecteerd en gedood. De factoren die bepalen of cellen kwaadaardig worden en uitgroeien tot een kanker zorgen er vaak ook voor dat de cellen vatbaarder worden voor virusinfecties. Als gevolg daarvan faciliteren de kankercellen de virusrelicatie, dat is de vermenigvuldiging, van virussen die zich normaal gesproken niet heel effectief vermenigvuldigen in onze cellen en daarmee relatief onschadelijk zijn voor onze gezondheid. Positieve resultaten in het onderzoek naar het gebruik van virussen in anti-kankertherapieën hebben recent geleid tot het toelaten van T-VEC, Talimogene laherparepvec, voor de behandeling van een specifieke groep huidkankerpatiënten. Het middel wordt nu onder de naam Imlygic gebruikt. Wellicht maakt de goedkeuring van Imlygic het makkelijker voor andere oncolytische virussen om te worden toegelaten voor de behandeling van kankerpatiënten.

Reovirus is een virus met een dubbelstrengs RNA genoom bestaande uit tien verschillende segmenten van zo'n 23.500 baseparen in lengte. Dit virus heeft van zichzelf ook de eigenschap om zich bij voorkeur in kankercellen te vermenigvuldigen en deze cellen hierbij te doden. Daarom wordt het reovirus ook bestudeerd als anti-kankermiddel. Het lijkt niet specifiek te werken in één kanker type, maar bij een breed scala aan kankertypes. Het gebruik van reovirus in patiënten lijkt veilig, maar de effecten op tumorgrootte en overleving van de patiënten lijkt gelimiteerd. Er zijn verschillende manieren waarop geprobeerd wordt de klinische effectiviteit te verhogen.

In dit proefschrift beschrijf ik het onderzoek dat ik heb uitgevoerd naar deze reovirussen. In **hoofdstuk 2** geef ik een uitgebreid overzicht van de belangrijke aspecten waarmee rekening moet worden gehouden bij het ontwikkelen van reovirus als een effectief anti-kankermiddel. Er wordt ingegaan op de factoren die betrokken zijn bij het effectief binnengaan van het virus in de cellen, bij de replicatie, het doden van de kankercel, en het aanzetten van immuunreacties. Daarnaast beschrijft het verschillende manieren om de effectiviteit van reovirus te verhogen. In dit proefschrift wordt daarna verder ingegaan op twee van deze manieren.

Allereerst hebben wij geprobeerd verder bloot te leggen welke eigenschappen en factoren in de cel belangrijk zijn om een efficiënte replicatie van reovirus te bewerkstelligen. In **hoofdstuk 3** wordt omschreven dat verschillende Atg-eiwitten de replicatie van reovirus beïnvloeden. Dit zijn eiwitten die hoofdzakelijk bekend zijn om hun functie in de autofagie-pathway van de cel. De autofagie-pathway is een signaleringsroute in de cel die aangezet wordt wanneer er weinig voedingsstoffen voorhanden zijn. De cel kan dan zijn eigen inhoud als het ware recyclen en de bruikbare stoffen hergebruiken om te overleven. Wij hebben



gevonden dat specifieke eiwitten die betrokken zijn bij het uitvoeren van de autofagie-signaleringsroute ook belangrijk zijn voor de replicatie van reovirus. Dit doet vermoeden dat de autofagie-route belangrijk is voor de replicatie van het reovirus. Echter, een interessante bevinding was dat niet álle Atg-eiwitten uit de autofagie-pathway de replicatie van reovirus beïnvloeden. Daarom concluderen wij dat niet noodzakelijk de autofagie-route zelf belangrijk is voor reovirus replicatie. Vermoedelijk doen de Atg-eiwitten die reovirus replicatie beïnvloeden dit eerder op een manier die onafhankelijk is van hun functie in de autofagie-pathway.

Een andere manier om de effectiviteit van reovirus te verhogen is door het gebruiken van krachtigere varianten van het virus. In **hoofdstuk 4 en 5** beschrijven we verschillende genetisch-gemodificeerde varianten van reovirus. In deze virussen hebben we een deel van één van de genoom-segmenten, het S1 segment, vervangen door een zogenaamd transgen. Dit transgen is een stukje genetisch materiaal dat voor een eiwit codeert en dat niet afkomstig is van het virus. Op deze manier kan bereikt worden dat het virus een eiwit tot expressie brengt dat het normaal niet tot expressie brengt. Het S1 segment codeert voor het 'spike' eiwit van het reovirus genaamd $\sigma 1$. Als gevolg van het vervangen van een deel van S1 brengt het virus een verkort $\sigma 1$ eiwit tot expressie op zijn oppervlak. **Hoofdstuk 4** gaat verder in op een reovirus variant die E4orf4 tot expressie brengt. Dit is een eiwit waarvan bekend is dat het kanker-specifieke celdood stimuleert. Door het inbouwen van E4orf4 in reovirus probeerden wij een virusvariant te maken die de kankercellen efficiënter kan doden. Echter vonden wij geen toegevoegd effect van E4orf4 op het stimuleren van celdood door reovirus. Onze bevindingen duiden erop dat reovirussen met een verkort $\sigma 1$ maar zónder E4orf4 al erg effectief zijn in het doden van kankercellen en dat verdere toevoeging van een celdood-stimulerend eiwit overbodig is.

Hoofdstuk 5 beschrijft de productie van reovirussen die GM-CSF tot expressie brengen. GM-CSF is een immuun-stimulerend eiwit waarvan bekend is dat het waardevol kan zijn voor toepassing in kankerpatiënten. Het stimuleert de ontwikkeling van zogenaamde dendritische cellen. Deze cellen kunnen helpen bij het aanwakkeren van een sterke anti-kanker immuunrespons. In gekweekte cellen laten wij zien dat de reovirussen die GM-CSF tot expressie brengen ook daadwerkelijk zorgen voor de productie van functioneel GM-CSF, dat de aanmaak en activatie van dendritische cellen stimuleert. Daarnaast tonen we in een muismodel van alvleesklierkanker aan dat het reovirus de systemische activatie van T-cellen stimuleert. T-cellen zijn immuun-cellen die erg belangrijk zijn bij het bewerkstelligen van een sterke, langdurige anti-kanker immuunrespons.

In **hoofdstuk 6** gaan we in op twee belemmeringen bij het klinisch inzetten van onze genetisch-gemodificeerde reovirussen: een relatief lage infectiviteit, en deletie-mutanten. De genetisch-gemodificeerde reovirussen hebben een 10- tot

750-voudige lagere infectiviteit ten opzichte van de ongemodificeerde reovirussen. Vermoedelijk komt dit doordat de gemodificeerde reovirussen een verkort $\sigma 1$ eiwit tot expressie brengen op hun oppervlak. Het $\sigma 1$ eiwit is betrokken bij het binnengaan van de cel en is korter in de genetisch-gemodificeerde reovirussen om plaats te maken voor de expressie van het extra potentieel therapeutische eiwit (E4orf4 of GM-CSF). Waarschijnlijk wordt de verkorte versie van $\sigma 1$ minder stabiel ingebouwd op het virale oppervlak, waardoor de infectiviteit verlaagd is. De tweede belemmering is dat er tijdens het opgroeien van de gemodificeerde reovirussen soms deleties optreden binnen het gemodificeerde S1 segment. In de deletie-mutanten zijn verschillende delen van het ingebouwde transgen en soms ook virus-afkomstige delen verwijderd uit het S1 segment. De verschillende deleties geven inzicht in de eventuele virus-afkomstige genoom-onderdelen die schijnbaar overbodig zijn. De meest waarschijnlijke achterliggende oorzaak van de deleties ligt in de 3D structuur van het S1 RNA segment. Onze bevindingen laten zien dat het mogelijk is om genetisch-gemodificeerde reovirussen te maken, maar dat het monitoren van de infectiviteit en genetische stabiliteit hierbij belangrijk zijn.

In **hoofdstuk 7** worden alle bevindingen samengevat en wordt verder bediscussieerd wat de beste manier is om verder te gaan met reovirussen voor toekomstige anti-kankertherapie ontwikkeling. Het is belangrijk om de gevoeligheid van verschillende kankers voor reovirus in kaart te brengen, zodat het mogelijk is om de behandeling daarop af te stemmen. Reovirus blijft een waardevol middel door zijn intrinsieke kanker-specificiteit en vermogen om zowel kankercellen te doden als een anti-kanker immuunrespons op te wekken. Er liggen veel mogelijkheden in het ontwikkelen van potentere virussen en het combineren van reovirus met andere oncolytische virussen of andere anti-kankermiddelen, met als ultieme doel dat elke kankerpatiënt uiteindelijk behandeld zal worden met een effectieve gepersonaliseerde therapie.



