

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/25830> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Authors:** Bovenberg, Maria Sarah Sophie & Degeling, Marja Hannah

**Title:** Cancer and glioma : an integrated approach of gene therapy and bioluminescence imaging

**Issue Date:** 2014-05-27

# CHAPTER XV



SAMENVATTING

## GLIOM TUMOREN

Glioblastoma multiforme (GBM) is de meest maligne variant van de glioom tumoren. Deze tumor staat niet alleen bekend om zijn extreem agressieve, invasieve groeipatroon, maar is daarnaast zeer moeilijk te behandelen. Met een 2-jaars overleving van 40% en een mediane overleving van 12 tot 18 maanden is de prognose somber. Factoren die hieraan bijdragen zijn onder te verdelen in twee groepen. Ten eerste zijn de huidige behandelopties niet in staat tumor progressie een halt toe te roepen. Het standaard behandelplan voor GBM tumoren bestaat uit chirurgische resectie van de tumor, gevolgd door bestraling en temozolomide chemotherapie. De locatie van de tumor (het brein) en zijn invasieve, grillige groeipatroon maken het echter praktisch onmogelijk de tumor in zijn totaliteit te verwijderen, terwijl radiotherapie niet in optimale dosering kan worden toegediend door mogelijke schade aan het omliggende weefsel. Verder is de waarde van chemotherapeutica beperkt, doordat de bloed-hersenbarrière efficiënte opname verhindert. Hoewel bestaande behandelingen de levensverwachting van patiënten met GBM hebben verlengd van 4-6 maanden naar 12-18 maanden, lijken de ontwikkelingen en ziekte winst achter te blijven bij de progressie die op andere terreinen van kankeronderzoek geboekt wordt.

De tweede complicerende factor in het GBM onderzoek, die nauw gerelateerd is aan de minieme ontwikkelingen op therapeutisch gebied, is de biologische complexiteit van de GBM tumor formatie. GBM tumoren zijn bijzonder heterogeen, brengen verschillende anti-apoptose mechanismen tot expressie, onderdrukken het immuunsysteem, groeien volgens een zeer invasief patroon diep in het omringende weefsel, en bezitten daarnaast een hele gereedschapskist aan mogelijkheden om het extratumorale weefsel naar hun voordeel te moduleren. Glioma stam cellen (GSC) lijken de drijvende kracht in dit proces. Recent onderzoek heeft aangetoond dat deze cellen in staat zijn een exacte kopie van de originele tumor te genereren, wanneer ze getransplanteerd worden in immuungecompromitteerde muizen. Verder kunnen verschillende genetische veranderingen worden aangetoond, die corresponderen met een specifiek groeipatroon, de mate van invasiviteit en, belangrijkste van al, respons op behandeling.

Waar patiënten met verlies van chromosoom 1p goed reageren op een chemotherapie schema van temozolomide en PVC (procarbazine, CCNU en vincristine), heeft dezelfde behandeling bij patiënten met een EGFR-III mutatie geen enkel effect. O6-methylguanine DNA transferase (MGMT) status is momenteel de meest accurate voorspeller van een goede reactie op temozolomide behandeling. MGMT is een DNA herstel eiwit dat cellen beschermt tegen schade ten gevolge van straling en alkaliserende middelen. In een bepaald percentage GBM tumoren is MGMT gemethyleerd, wat leidt tot een onvermogen temozolomide geïnduceerde DNA schade te herstellen, resulterend in celdood.

Nieuw interventies zijn gezien de huidige stand van zaken meer dan gewenst. Gen therapie werd lange tijd beschouwd als de magische oplossing voor de genezing van velerlei ziekten, waaronder kanker. In klinische studies is echter naar voren gekomen dat deze strategie nog flink wat hindernissen te overwinnen heeft, voordat we kunnen spreken van een doorbraak in de geneeskunde. Hoewel enkele grote successen zijn gerapporteerd, is het percentage studies dat een klinisch relevant resultaat behaalt, nog altijd laag. Een gebrek aan adequate gen overdracht en distributie, en het onvermogen om hoge expressie waarden te bewerkstelligen, zijn enkele van de problemen die overwonnen moeten worden. Het immuunsysteem van de patiënt, dat het gen en bijbehorende virus vector als lichaamsvreemd beschouwd, speelt hierin een belangrijke rol. Aangezien inadequate gen expressie confounding van studie resultaten kan opleveren, waarbij men onterecht aanneemt dat de gekozen therapie niet werkt, is het lastig oordelen over de daadwerkelijke effectiviteit van gen therapie. Dit biedt mogelijk ook een verklaring voor de inconsistentie tussen resultaten verkregen in diermodellen en in klinische studies.

## **BIOLUMINESCENCE IMAGING**

Om een beter inzicht te krijgen in de processen die een rol spelen bij de GBM tumorformatie en om een aanknopingspunt te vinden voor een succesvolle therapeutisch benadering, is het van groot belang om de gebeurtenissen die op cellulair, moleculair en genetisch niveau plaats vinden, te begrijpen. Bioluminescence imaging (BLI) is een techniek die de enzymatische activiteit van luciferases gebruikt om intra- en extracellulaire processen- letterlijk- zichtbaar te

maken. Wanneer een luciferase in contact komt met zijn substraat, wordt licht uitgezonden. Koppeling van het luciferase gen aan het gen dat men wil onderzoeken (gene of interest, GOI), leidt tot het ontstaan van een Bioluminescence signaal op het moment dat het GOI actief wordt (bijvoorbeeld in respons op een bepaald medicijn), terwijl geen signaal gedetecteerd kan worden wanneer activatie niet plaats vindt. *American Firefly* luciferase (Fluc), *Gaussia princeps* (Gluc), *Renilla reniformis* (Rluc) en *Vargulla hilgendorfi* (Vluc) zijn voorbeelden van luciferases die met succes gebruikt zijn als reporters in verscheidene cel systemen.

BLI is een techniek die meer en meer gebruikt wordt in het kankeronderzoek. Door de hoge mate van complexiteit van GBM tumoren, de vele interacties tussen tumorcellen en het omringend weefsel, de intracellulaire crosstalk en het invasieve groeipatroon, is het bijzonder waardevol om cellen te kunnen labelen en vervolgen. Ook de identificatie van de intracellulaire pathways die dit gedrag bewerkstelligen is een cruciaal onderdeel van de zoektocht naar een therapeutische interventie. BLI kan ons helpen deze complexe processen te begrijpen door zichtbaar te maken 'wat er nou precies gebeurt' tijdens de tumorigenese. De activatie van specifieke genen, de groei en gedragsveranderingen van cellen, de effecten van Kanker Stam Cellen (cancer stem cells, CSC) en hun patroon van metastase en recidief formatie na chemotherapie kan theoretisch allemaal gevolgd worden via BLI. Ook de tumor cel respons op bepaalde middelen, met activatie van bepaalde pathways en escape routes, zou via BLI in beeld gebracht moeten kunnen worden, met een 'map' van mogelijke interventiepunten als resultaat. Aangezien BLI zowel *in vitro* als *in vivo* toepasbaar is, kan het tevens een belangrijke 'tool' worden voor de validatie van experimentele anti kanker medicijnen in diermodellen, daarmee een brug slaand tussen cel modellen en de kliniek.

In dit proefschrift hebben we de krachten van genterapie en Bioluminescence imaging gecombineerd voor de ontwikkeling van nieuwe reporters, diagnostische tools en een potentieel therapeutische interventie voor GBM.

## OVERZICHT

In dit proefschrift hebben we reporters, diagnostische tools en een “curatieve strategie” ontwikkeld voor de behandeling van Glioom tumoren, op basis van gen therapie en BLI.

In **Hoofdstuk III** beschrijven we de ontwikkeling van een nieuwe assay voor de detectie van Gluc in het bloed, gebaseerd op een antilichaam reactie. *Gaussia* luciferase verschilt van andere luciferases in feit dat het gesecreteerd wordt door de cellen die het Gluc gen tot expressie brengen en in de circulatie terecht komt. De voordelen van deze eigenschap zijn enorm. In plaats van meting van het BLI signaal door middel van een CCD camera (wat een tijdrovend en statisch proces is) of door opoffering van het proefdier, kan worden volstaan met het afnemen van enkele druppels bloed waaruit vervolgens het Gluc signaal bepaald kan worden. Dit stelt men in staat om *ex vivo in vivo* processen te vervolgen op het moment dat deze ook daadwerkelijk plaatsvinden (en niet pas minuten, uren of dagen later). Voor het ontrafelen van tumorgeneese is dat van onvoorstelbaar belang. Een limiterende factor in deze strategie werd gevormd door het feit dat Gluc blauw licht uitstraalt. Blauw licht wordt geabsorbeerd door gepigmenteerde moleculen als hemoglobine, wat de sensitiviteit van de assay sterk doet afnemen, aangezien een deel van het signaal verdwijnt. Om dit probleem te omzeilen hebben we een alternatieve assay ontwikkeld, waarin Gluc wordt ‘gevangen’ uit het bloed door een antilichaam, voordat de Bioluminescence reactie plaatsvindt. Doordat de reactie nu plaats kan vinden in de afwezigheid van signaal absorberende moleculen, is de sensitiviteit van het bloed assay met meer dan een orde van grootte toegenomen en zijn we in staat om een tiental circulerende cellen en beginnende metastasen te detecteren.

In **Hoofdstuk IV** beschrijven we de ontwikkeling van een multiplex reporter in het bloed gebaseerd op secreted alkaline phosphatase (SEAP), *Gaussia* luciferase en *Vargula hilgendorfi*, voor het *ex vivo* analyseren van gebeurtenissen *in vivo*. Vluc was nog niet eerder gebruikt als reporter in het bloed en moest daarom eerst gekarakteriseerd worden. Vervolgens zijn Vluc, Gluc en SEAP gebruikt voor de ontwikkeling van een reporter die gebruikt kan worden voor het gelijktijdig meten van drie verschillende biologische parameters in het bloed. Waar in de praktijk de CCD

camera gebruikt wordt om de activiteit van luciferases te monitoren, volstaat voor deze nieuwe reporter het afnemen van enkele druppels bloed op de door de onderzoeker gewenste tijdstippen. Dit heeft niet alleen het voordeel dat de procedure zo een stuk minder tijd in beslag neemt, maar daarnaast stelt het de onderzoeker in staat in real time cellulaire processen te vervolgen, zonder rekening te hoeven houden met de halfwaarde van een eventueel eerder gemeten signaal. Om de reporter te testen werd de reactie van 3 verschillende glioma cel lijnen op het chemotherapeuticum temozolomide gelijktijdig gemeten in hetzelfde proefdier. De drie verschillende signalen waren goed van elkaar te onderscheiden en leken niet met elkaar te reageren. Dit systeem kan op heel veel verschillende gebieden worden toegepast.

In **Hoofdstuk V** beschrijven we de ontwikkeling van een drievoudig reporter systeem, gebaseerd op *Vargula*, *Gaussia* en *Firefly* luciferase, voor het gelijktijdig vervolgen van drie verschillende biologische processen *in vivo*. Dit systeem is vervolgens gebruikt om het effect van soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (sTRAIL, verpakt in een AAV vector) gecombineerd met de cardiac glycoside Lanatoside C in verschillende glioom modellen te evalueren. De TRAIL death-receptor wordt alleen tot expressie gebracht door tumor cellen, waardoor gezonde cellen geen schade ondervinden van de toediening van TRAIL. Er lijkt echter ook een groep tumoren te bestaan, die niet gevoelig is voor door TRAIL gemedieerde celdood. Gliomen behoren helaas tot deze groep. In een poging deze resistentie te overwinnen, hebben we een screen gedaan naar moleculen die glioomcellen gevoelig maken voor TRAIL, leidend tot de identificatie van Lanatoside C.

Aangezien TRAIL niet instaat is de bloed hersen barriere te passeren, hebben we eerst het gezonde hersenweefsel gemodificeerd om sTRAIL tot expressie te brengen. Dit resulteerde in de formatie van een 'zone of resistance' rondom de tumor cellen. Lanatoside C werd vervolgens gebruikt als therapeuticum. Om een inzicht te krijgen in het precieze werkingsmechanisme van ons systeem is VLuc expressie gekoppeld aan het AAV-sTRAIL gen, waardoor gen-transfer en expressie gekwantificeerd kon worden. Daarnaast is Gluc expressie gekoppeld aan activatie van de glioma death receptor en de daaropvolgende activatie van intracellulaire cascades, terwijl Fluc als maat dient voor de reactie van de tumor op de

gecombineerde behandeling van sTRAIL en Lanatoside C. Hierdoor konden we zien dat de binding van TRAIL aan de tumorcellen (Vluc) leidde tot de activatie van verschillende intracellulaire pathways (Gluc) en een initiële afname van de glioom cel proliferatie (Fluc). Dit werd echter gevold door een fase van hergroei door therapie resistente cellen (Fluc). Wanneer we echter sTRAIL tegelijk met Lanatoside C toedienden, bleek dat ook de subpopulatie van resistente cellen werd geëlimineerd. Aangezien AAV-vectoren, TRAIL en Lanatoside C allen onafhankelijk van elkaar al enkele jaren met goedkeuring van de FDA in de kliniek gebruikt worden, zou het relatief eenvoudig moeten zijn om deze combinatietherapie voor GBM voor patiënten beschikbaar te maken. Het drievoudige *in vivo* BLI reporter systeem dat wij ontwikkeld hebben voor deze studie is het eerste in zijn soort, en heeft een brede toepasbaarheid in vele onderzoeksgebieden.

In **Hoofdstuk VI** beschrijven we de ontwikkeling van nieuwe en betere varianten van *Gaussia* luciferase, die zowel gebruikt kunnen worden in de boven beschreven reportersystemen (Hoofdstuk 3, 4 en 5) als op zichzelf. *Gaussia* luciferase heeft vele eigenschappen die het de luciferase van keuze maakt voor velerlei toepassingen, zoals een hoge signaal intensiteit, gunstige enzym stabiliteit en een secretie sequentie, die detectie in het bloed mogelijk maakt. Echter, de emissie van licht in de blauwe zone van het spectrum (zoals besproken in hoofdstuk III) en een flash-type bioluminescence reactie, maken dat Gluc niet voor alle toepassingen even geschikt is. De flash-type bioluminescence, waarbij snelle afname van het signaal volgt na contact met het substraat, is vooral onhandig wanneer grote hoeveelheden data geanalyseerd dienen te worden, zoals bij een high throughput drug screen. De waarde van Gluc als cell viability marker is in die situatie beperkt, aangezien er, puur door de tijd die het kost het signaal te lezen, afname van de signaal intensiteit ontstaat, en het begin en einde van de screen daardoor niet goed met elkaar vergeleken kunnen worden. In een poging deze eigenschap te veranderen, hebben wij een middels 'directed molecular evolution' een library van > 5000 Gluc varianten gegenereerd. Al deze varianten zijn gescreend voor signaal intensiteit, een shift in emissiespectrum, en glow-type (stabiele) licht emissie. De screen heeft verschillende varianten met een 10 tot 15nm shift in emissie spectrum opgeleverd en een Gluc variant met een licht output die stabiel bleef gedurende 10 minuten. Deze laatste variant is daarmee bijzonder geschikt voor high throughput applicaties.



Het is ook mogelijk verschillende varianten van dezelfde luciferase tegelijk toe te passen, zolang ze maar verschillen in lichtemissie. In **hoofdstuk VII** hebben we een codon geoptimaliseerde variant van de Italian Firefly luciferase (liFluc) gekarakteriseerd voor genexpressie in zoogdiercellen. Bovendien hebben we de rood-lichtemissie variant toegepast in *in vivo* tumor beeldvorming. De rode variant bleek een succesvolle marker voor het in tijd volgen van tumorgroei.

In **Hoofdstuk VIII** en **IX** beschrijven we het ontstaan van een eenvoudige en sensitieve assay voor het detecteren van mycoplasma contaminatie. Mycoplasma contaminatie in celkweek wordt vaak niet opgemerkt, maar is een ernstig probleem dat een scala aan cellulaire veranderingen veroorzaakt en daarmee onderzoeksresultaten in sterke mate kan beïnvloeden. Aangezien celkweek de fundatie vormt voor glioomonderzoek en mycoplasmacontaminatie kan leiden tot het weggooien van jaren van onderzoek, hebben we een mycoplasma detectie assay ontwikkeld gebaseerd op de degradatie van Gluc in het medium van gecontamineerde cellen. Onder normale omstandigheden heeft Gluc een halfwaardetijd van > 7 dagen. Echter, in de aanwezigheid van Mycoplasma wordt Gluc afgebroken met een snelheid die direct correspondeert met de hoeveelheid mycoplasma contaminatie. Ons op Gluc gebaseerde mycoplasma detectie assay is daarmee sensitiever dan de detectie kits die momenteel commercieel verkrijgbaar zijn.

Ons onderzoek naar de therapie en diagnostiek naar hersentumoren neemt een andere wending in **hoofdstuk X**: we hebben een liposoom ontworpen die over een hogere contrastintensiteit voor MRI onderzoek beschikt dan de conventionele liposoom. Liposomen zijn sferische, afgesloten structuren die uit een dubbele lipide buitenlaag bestaan met daartussen en in het centrum van de liposoom een waterachtige substantie. Ze zijn bewezen effectief voor het vervoer van drugs en beeldvormende stoffen naar de tumorcellen. Onze liposoom kan vanwege zijn biotin doelgericht specifieke cellen bereiken, zijn baan kan worden gevolgd met MRI, en vanwege zijn thermosensitiviteit kan de therapeutische inhoud op de gewenste locaties worden vrijgelaten met behulp van Ultra Sound.

In **Hoofdstuk XI** en **XII** geven we tot slot een overzicht van de huidige stand van zaken in het glioom onderzoek, waardoor het werk van dit proefschrift in een breder kader geplaatst kan worden. We bespreken verschillende onderzoeksstrategieën, zowel in experimentele setting als in de kliniek, en evalueren het gat dat tussen beide werelden bestaat. Verder gaan we in op stappen die ons in ziens ondernomen moeten worden om het onderzoeksveld op een hoger plan te tillen. Cel therapie (zowel stam cel therapie als immunocell therapie) lijkt een oplossing te bieden voor veel van de problemen die de effectiviteit en progressie van het gentherapie onderzoek momenteel belemmeren. Stam cellen kunnen gebruikt worden als transport middel voor therapeutische genen en zijn in staat specifiek glioom cellen op te sporen, zelfs wanneer het metastasen betreft, bestaande uit slechts enkele cellen. Ze passeren zonder moeite de bloed –hersenbarrière en hebben een lokaal immunosuppressieve werking, wat voorkomt dat er een immuunreactie volgt na transplantatie. Ook schermen ze het therapeutische gen af van het immuunsysteem, wat leidt tot een vele male effectievere gen-transfer en een langdurige antitumor respons. Immuun cellen daarentegen worden vaak gebruik als cel vaccins en maken juist gebruik van het immuunsysteem van de patiënt. Het voordeel van deze aanpak is dat het eigen immuunsysteem van de patiënt wordt gestimuleerd om de tumor aan te vallen, wat niet alleen leidt tot eradicatie van de tumor, maar de patiënt in theorie ook zou moeten beschermen tegen het ontstaan van recidieven. Zowel stamcel- als immunotherapie vindt langzaam de weg naar de kliniek, waar de eerste trials laten zien dat ze (in ieder geval op korte termijn) veilig zijn en goed getolereerd worden. De resultaten uit experimentele studies heeft men nog niet kunnen evenaren, maar voorbeelden uit andere onderzoeksgebieden laten zien dat met de nodige optimalisatie veel van de huidige problematiek overwonnen kan worden. Suggesties voor verbeteringen, en de potentiële rol van BLI hierin, worden besproken in hoofdstuk XI en XII en XIII.

