Universiteit Leiden
The Netherlands

The use of light in cancer immunotherapy

Kleinovink, E.J.W.

Citation
Kleinovink, E. J. W. (2018, April 19). *The use of light in cancer immunotherapy*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/61631

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/1887/61631

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

Cover Page

Universiteit Leiden

Leiden University Repository

The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:
http://hdl.handle.net/1887/61631

Author: Kleinovink, E.W.J.
Title: The use of light in cancer immunotherapy
Issue Date: 2018-04-19

Appendices

Nederlandse Samenvatting

Dankwoord

Curriculum Vitae

List of publications

Nederlandse samenvatting

De Nederlandse samenvatting van dit proefschrift is bewust geschreven voor leken, waarbij zo weinig mogelijk wetenschappelijke termen zijn gebruikt en er hier en daar wat is gegeneraliseerd of selectief benoemd om de boodschap goed over te brengen.

1. Over de strijd tussen kanker en het immuunsysteem

Wanneer er bij een patiënt een tumor wordt gevonden, heeft deze tumor al een lange geschiedenis achter de rug waarin het immuunsysteem in veel gevallen een rol heeft gespeeld. Anders gezegd: het feit dat een tumor zo ver is gekomen dat hij kan worden opgemerkt in scans en klachten geeft, betekent waarschijnlijk dat hij erin is geslaagd aan het immuunsysteem te ontsnappen. Dit immuunsysteem is namelijk uitstekend in staat om tumorcellen te herkennen en aan te vallen, op vergelijkbare wijze als het dat doet wanneer iemand een infectie heeft. Tumorcellen zijn namelijk anders dan onze eigen normale cellen, en het immuunsysteem heeft als taak om lichaamsvreemde dingen op te ruimen, zoals dat gebeurt bij afstoting van een donororgaan of bij het oplossen van een virusinfectie. De manier waarop tumorcellen lichaamsvreemd zijn, en als zodanig worden herkend door het immuunsysteem, laat zich het best uitleggen door te beginnen bij het vroegste begin van kanker.

De ontwikkeling van een tumorcel begint met mutaties in het DNA. DNA is de blauwdruk voor het maken van eiwitten: elk eiwit heeft zijn eigen stukje DNA (een gen) en mutaties in een gen kunnen leiden tot veranderingen in het betreffende eiwit. Mutaties vinden continu plaats bij celdeling van gezonde cellen, maar worden ook veroorzaakt door blootstelling aan bijvoorbeeld UV-licht of kankerverwekkende stoffen. In veruit de meeste gevallen worden de mutaties opgemerkt en gecorrigeerd door DNA-herstelmechanismes van de cel zelf. In sommige gevallen blijven de mutaties wel bestaan. Meestal hebben deze mutaties geen merkbaar effect op de cel omdat ze niet hebben geleid tot veranderingen in eiwitten, of omdat deze eiwitten niet zo belangrijk waren, maar in sommige gevallen raakt er wel een belangrijk eiwit in zijn functie verstoord. Vaak heeft de cel hier behoorlijk nadeel van en zal dit leiden tot de dood van deze cel, maar in sommige gevallen kan de verstoring leiden tot een voordeel in de groei of overleving van een cel. Voorbeelden van processen die vaak verstoord zijn in tumorcellen zijn het al eerder genoemde DNA-herstel en mechanismes die voorkomen dat een cel zich oneindig kan vermenigvuldigen en ervoor zorgen dat de cel op zijn natuurlijke plek in het weefsel blijft zitten. Kortom, mutaties meestal worden gecorrigeerd, en niet-gecorrigeerde mutaties hebben meestal een negatief of geen enkel effect. De kans is dus klein dat de verschillende

belangrijke processen die een cel in toom houden allemaal worden uitgeschakeld door toevallige mutaties. Dit kansspel met minieme kans op tumorcelvorming kan daarom tientallen jaren duren, zelfs in het geval van dagelijkse massale blootstelling aan kankerverwekkende stoffen zoals bij roken.

Zodra alle belemmeringen zijn verbroken en er toch een tumorcel is ontstaan, is de strijd nog lang niet gewonnen door de tumorcel: hij zal namelijk moeten zien te ontsnappen aan het immuunsysteem. Hoe herkent het immuunsysteem een tumorcel als lichaamsvreemd? Beter is het de omgekeerde vraag te stellen: hoe herkent het immuunsysteem onze gezonde eigen cellen als lichaamseigen? De cellen van ons lichaam laten continu hun inboedel zien aan het immuunsysteem, door de eiwitten van de cel in stukjes te knippen en aan het oppervlak tentoon te stellen. Immuuncellen scannen het oppervlak van alle cellen die ze tegenkomen, en hebben tijdens hun ontwikkeling geleerd om cellen met rust te laten wanneer er alleen lichaamseigen stukjes eiwit worden gevonden. Dit is de link tussen DNA-mutaties en het immuunsysteem: wanneer mutaties in genen leiden tot veranderingen in eiwitten, en een cel deze veranderde en dus lichaamsvreemde stukjes eiwit aan zijn oppervlak tentoonstelt, kan de cel worden herkend en aangevallen door het immuunsysteem. Ook dit is weer een kansproces: niet alle veranderde stukjes eiwit vormen een bruikbaar herkenningsteken voor het immuunsysteem. Wanneer er wel herkenning plaatsvindt, begint de evolutionaire strijd tussen tumorcellen en het immuunsysteem pas op volle toeren. Tumorcellen kunnen bijvoorbeeld hun ‘tentoonstellingsmechanisme’ uitschakelen, maar het immuunsysteem heeft dan weer speciale cellen die cellen aanvallen waarop niets tentoongesteld wordt. Een andere manier om te ontsnappen aan een aanval van het immuunsysteem is door de lokale omstandigheden in de tumor zo ongunstig mogelijk te maken voor immuuncellen. Ook kunnen tumorcellen misbruik maken van bepaalde remmingsmechanismes op immuuncellen, die bedoeld zijn om al te hevige immuunreacties zoals auto-immuunziektes te voorkomen. In deze strijd tussen tumor en immuunsysteem gelden de basisprincipes van evolutie: er is geen programma of bewuste sturing, tumoren ‘weten’ niet wat ze moeten doen, en tumorcellen gaan dan ook massaal ten onder aan immuun-aanvallen. Er is echter in tumoren een grote variëteit aan tumorcellen, onder andere omdat het DNA-herstel is uitgeschakeld en er daardoor een wildgroei aan DNA-mutaties optreedt en er een bonte verzameling veranderde eiwitten aanwezig is in de cellen. Verschillende tumorcellen in een tumor bevatten daarom doorgaans voor een deel dezelfde DNA-mutaties die nog stammen uit het vroegste begin, maar ook cel-eigen DNA-mutaties die later zijn ontstaan. Door deze variëteit zijn er van de duizenden of miljoenen tumorcellen in een tumor altijd wel een paar die bij toeval een ontsnappingsmechanisme hebben ingeschakeld. Deze cellen zullen als enige

overleven en zich vermenigvuldigen, zodat na enige tijd de tumor grotendeels bestaan uit deze cellen: de tumor is geüpgraded (zo schrijf je dat blijkbaar). Het feit dat een patiënt met een merkbare tumor bij de dokter komt, betekent dus vaak dat deze tumor gedurende zijn ontwikkeling succesvol aan het immuunsysteem is ontsnapt.

2. Immuuntherapie voor kanker

Nu u weet dat het immuunsysteem tumorcellen kan herkennen en opruimen, en dat tumoren op hun beurt ontsnappingsmechanismes hiertegen kunnen ontwikkelen, zal het u niet verbazen dat men volop probeert behandelingen te ontwikkelen die er specifiek op gericht zijn om het immuunsysteem tumoren op te laten ruimen. Immuuntherapie voor kanker beoogt immuunresponsen tegen tumorcellen op te wekken, of bestaande immuunresponsen te versterken, bijvoorbeeld door de immuun-remmingsmechanismes te blokkeren.

Het immuunsysteem kent vele verschillende types cellen en moleculen die betrokken zijn bij immuunresponsen. De immuuncellen die bij uitstek lichaamsvreemde stukjes eiwit herkennen en vervolgens de betreffende cel kunnen doden, heten T-cellen. De T staat voor de thymus, het orgaan waar de T-cellen 'geschoold' worden om lichaamsvreemd van lichaamseigen te onderscheiden. Van deze T-cellen hebben tumorcellen veel te duchten, en hun ontsnappingsmechanismes zijn voornamelijk op T-cellen gericht. Ook de meeste vormen van immuuntherapie voor kanker zijn op T-cellen gericht: vaccinaties om T-celresponsen op te wekken, antilichaam-behandelingen om T-celresponsen te versterken, of simpelweg injectie van grote aantallen anti-tumor T-cellen die in het laboratorium zijn geprepareerd. Immuuntherapie is de grootste recente doorbraak in de behandeling van kanker, maar helaas reageert maar een deel van de patiënten goed op deze therapie. Tumorcellen kunnen resistent zijn voor een bepaalde behandeling, maar ook resistent worden, bijvoorbeeld door over te schakelen naar een ander ontsnappingsmechanisme. Zelfs na medisch ingrijpen gaat de evolutionaire strijd tussen tumor en immuunsysteem dus nog door. Er zijn twee belangrijke manieren waarop wetenschappers proberen dit probleem aan te pakken. Ten eerste moeten we weten hoe immuuntherapie precies werkt, om erachter te kunnen komen waarom de therapie niet bij iedereen succesvol is. Daarnaast wordt er volop onderzoek gedaan naar combinatie-behandelingen van immuuntherapie plus een andere therapie, met het doel een sterkere immuunrespons te krijgen waartegen de tumor zich minder goed kan verweren. In dit proefschrift staan voorbeelden beschreven van beide strategieën, en licht speelt hierbij een centrale rol. De weinig creatieve titel van het proefschrift is dan ook:

3. Het gebruik van licht in kanker-immuuntherapie

Het proefschrift bestaat uit zeven hoofdstukken. Het eerste hoofdstuk is een algemene inleiding op de verschillende onderwerpen die in het proefschrift aan bod komen, met een overzicht van de wetenschappelijke vraagstellingen die in de verschillende hoofdstukken onderzocht worden. In het laatste hoofdstuk worden de bevindingen samengevat en bediscussieerd. De overige vijf hoofdstukken bevatten de resultaten van mijn promotieonderzoek.

Als eerste worden combinatiebehandelingen beschreven van immuuntherapie met een ander type behandeling genaamd FotoDynamische Therapie (Engelse afkorting: PDT). Bij PDT wordt een stof in het lichaam ingespoten die pas effect heeft na blootstelling aan licht. Deze stof verspreidt zich door het hele lichaam, maar door alleen de tumor te belichten wordt de stof alleen daar geactiveerd en richt het alleen daar schade aan. Op deze manier maakt PDT dus alleen in de tumor cellen dood, het heeft dan ook veel minder vervelende bijwerkingen dan bijvoorbeeld chemotherapie. Daarnaast veroorzaakt PDT in tegenstelling tot chemotherapie en radiotherapie geen nieuwe DNA-mutaties.

In **hoofdstuk 2** wordt PDT gecombineerd met peptide-vaccinatie, een type immuuntherapie waarbij kleine stukjes eiwit (peptides) worden ingespoten als vaccin tegen de tumor. Dit zijn dezelfde stukjes eiwit die leiden tot herkenning van lichaamsvreemde cellen door T-cellen. Het doel van peptide-vaccinatie is dan ook om een sterke T-celrespons te krijgen. Muizen met een tumor werden behandeld met PDT, waardoor een groot deel van de tumor doodging, maar later groeide de tumor toch weer verder. Door de muizen te vaccineren met stukjes lichaamsvreemd tumoreiwit werden T-cellen geactiveerd die specifiek de tumor herkennen. Bij deze combinatietherapie konden de tumoren volledig worden opgeruimd, en we hebben aangetoond dat het inderdaad de T-cellen zijn die de na PDT overgebleven tumorcellen opruimden. Nu is het voor peptide-vaccinatie nodig om te weten welke stukjes eiwit op de tumorcellen zitten en belangrijk zijn bij de herkenning door T-cellen. Wanneer dit niet bekend is, kunnen er andere soorten immuuntherapie gebruikt worden die niet tumor-specifiek zijn.

In **hoofdstuk 3** wordt een dergelijke immuuntherapie getest in combinatie met PDT. Deze immuuntherapie bestaat uit het toedienen van een antilichaam dat het molecuul CTLA-4 op T-cellen blokkeert en hiermee een bekend remmingsmechanisme van T-cellen opheft, wat leidt tot hogere activiteit van de T-cellen. We hebben deze combinatiebehandeling getest in muizen met een type tumor dat spontaan al wel herkend wordt door T-cellen, maar aan de aanval weet te ontsnappen. Ook in dit geval zien we een duidelijk verbeterd effect van combinatiebehandeling ten

opzichte van de beide individuele behandelingen, en wederom een cruciale rol voor T-cellen in het opruimen van de tumoren. Deze twee hoofdstukken tonen aan dat immuuntherapie goed gecombineerd kan worden met andere therapieën zoals PDT. Dit is relevante informatie, aangezien patiënten met gevorderde kanker niet goed reageren op peptide-vaccinatie en een aanzienlijk deel van de patiënten weinig baat heeft bij behandeling met het antilichaam tegen CTLA-4. PDT wordt al tientallen jaren toegepast bij kankerpatiënten, dus het is relatief eenvoudig om te onderzoeken of de combinatie met immuuntherapie ook in mensen beter werkt.

In de overige hoofdstukken hebben we licht niet gebruikt om een effect te veroorzaken in de muis, maar juist om te kunnen zien wat er gebeurt binnenin de muis, dus als beeldvormende techniek (in het Engels: imaging). Het doel van het project beschreven in **hoofdstuk 4** was om erachter te komen wat er gebeurt met een peptide-vaccin na toediening in het lichaam. Hiervoor hebben we een fluorescerende (lichtgevende) kleurstof aan het vaccin gekoppeld. Deze aanpak bleek succesvol: de fluorescentie kon duidelijk worden waargenomen op de plek van injectie, waarbij de hoeveelheid geleidelijk afnam in de tijd. Het vaccin wordt namelijk getransporteerd naar lymfeklieren, waar T-cellen en andere immuuncellen wachten om geactiveerd te worden (de gezwollen lymfeklieren tijdens een verkoudheid of andere infectie zijn deels het gevolg van grootschalige activatie en vermenigvuldiging van T-cellen). Het transport van het vaccin vanaf de injectieplek naar de lymfeklieren kon eenvoudig worden gevisualiseerd. We hebben verschillende toedieningsmethodes vergeleken die het vaccin langer of korter op de injectieplek zouden moeten vasthouden, en konden dit verschil inderdaad herkennen door de fluorescentie te meten.

In **hoofdstuk 5** hebben we deze fluorescentie-imaging getest bij een iets andere vaccinatiestrategie. Het vaccin werd wederom gelabeld met een fluorescerende stof, maar nu verpakt in een soort biologisch afbreekbaar bolletje. Het doel van de verpakking in bolletjes is om het vaccin beter te beschermen tegen afbraak door het lichaam en zo in totaal meer vaccin op de plek van bestemming te laten aankomen. Door de fluorescentie te meten op de injectieplek en de lymfeklieren konden we aantonen dat de bolletjes het vaccin langer op de plek van injectie hielden, waardoor er een geleidelijke maar uiteindelijk grotere hoeveelheid in de lymfeklieren aankwam.

In **hoofdstuk 6** tenslotte waren het juist de T-cellen zelf die we lichtgevend hebben gemaakt. Hiervoor gebruikten we geen fluorescerende stoffen, maar lichtgevende eiwitten die bekend zijn van bijvoorbeeld vuurvliegjes: luciferases. Zoals u inmiddels weet, worden eiwitten gemaakt vanuit een broncode in het DNA, en wetenschappers hebben de stukjes DNA met de code voor luciferases uit vuurvliegjes en andere

dieren kunnen isoleren. Dit stukje DNA hebben wij weer ingepast in het DNA van een muis, en wel op zo'n manier dat het alleen de T-cellen zijn waarbij de luciferases worden gemaakt. Sterker nog, we hebben twee luciferases met verschillende kleuren ingebouwd in de T-cellen: een groene die altijd actief is, en een rode die pas actief wordt als een T-cel zelf geactiveerd wordt. Kortom: een rustende T-cel geeft alleen groen licht, een geactiveerde T-cel geeft groen én rood licht. Door muizen te vaccineren en zo T-cellen te activeren, hebben we aangetoond dat deze twee-kleurenstrategie inderdaad werkt: de wachtende T-cellen in de lymfeklier waren groen, en pas na vaccinatie werden ze ook rood. De imaging-technieken beschreven in hoofdstuk 4 tot 6 kunnen gebruikt worden om te onderzoeken hoe immuuntherapie werkt, en waarom het in sommige gevallen niet werkt. Op basis van deze inzichten kan de behandelstrategie worden aangepast om een beter effect te krijgen, bijvoorbeeld door de timing, dosering of locatie van behandeling te veranderen of door de juiste combinatietherapie te kiezen.

Samengevat heeft het onderzoek beschreven in dit proefschrift op twee manieren geprobeerd een oplossing te vinden voor het beperkte succes van immuuntherapie bij gevorderde kanker: door combinatie-behandelingen toe te passen en door methodes te ontwikkelen die het inzicht in immuunresponsen tegen kanker kunnen vergroten.

Dankwoord

Ferry, je wist me vanaf het eerste sollicitatiegesprek enthousiast te maken voor het project, en ik hoefde niet na te denken toen je me uitnodigde om de baan aan te nemen. Je vertrouwen heeft mij enorm gemotiveerd. Clemens, bedankt voor je creativiteit die vele goede ideeën heeft opgeleverd die ook terug te vinden zijn in dit proefschrift. Marieke, we werkten vanaf het begin samen en je was zeer betrokken bij mijn onderzoek, wat ook officieel werd door je co-promotorschap. Dankjewel!

Laura, as two persons who are always fashionably late, we never had to wait for each other. I enjoyed our collaboration a lot and I'm glad you are still around occasionally. Sima, we have not reported it as an official Milestone of the CTMM project but for me our friendship was the most significant result! It was great doing experiments together. Thank you both for teaching me a lot about scientific disciplines that are not my own – I hope I learned enough to survive the defense! Natasa, I was lucky to have a student like you. You enthusiastically accepted a tricky project and soon it was already obvious that you would make a great PhD student, and indeed you have. Thanks to you and Christine for being my paranymphs! Thomas, Pieter, Maryam, Henrik, Charlotte, bedankt voor de goede samenwerking. De steun van wijlen Harrie Vink voor de PDT-projecten heeft de voortzetting van ons onderzoek mogelijk gemaakt en indirect ook geleid tot het absolute hoogtepunt van onze carrière: een publicatie in het Leidsch Dagblad.

De volgende zin zal menigeen bekend voorkomen vanwege eerdere proefschriften uit de groep: ik heb mij vanaf de eerste dag thuis gevoeld bij de Tumorimmunologie. Bedankt dat jullie allemaal een beetje raar zijn, waardoor ik er perfect tussen paste. Dank aan alle overige IHB'ers voor de nuttige meetings en de leuke borrels en buitendagen. ONCO'ers, eind 2010 lukte het me nog net even niet, maar tegenwoordig zijn we alsnog collega's. Dankjulliewel voor vele leerzame meetings en memorabele labuitjes.

Aangezien dit het dankwoord is voor mijn promotieonderzoek, niet voor mijn leven in het algemeen, heb ik het beperkt tot bij het promotieonderzoek betrokken personen en de verdere werkomgeving. Anderen voor wie ik grote dank of waardering heb, weten dit bovendien al lang. Teleurgestelde lezers die toch op een vermelding in het dankwoord hadden gehoopt, moeten het maar doen met: alle anderen ook bedankt hoor.

Curriculum Vitae

Jan Willem Kleinovink was born on the 29th of December 1986 in Den Ham, the Netherlands. In 2004 he obtained the VWO diploma at CSG Het Noordik in Almelo. At Radboud University Nijmegen, Jan Willem initially studied Medicine but switched to Biomedical Sciences in 2006. He completed the Bachelor program of Biomedical Sciences in June 2009, which included an internship in the group of dr. Leo Joosten at the Experimental Rheumatology lab at Radboud University, studying the possible synergy between IL-17 and TLR ligands, supervised by dr. Marije Koenders. In the Master's program of Biomedical Sciences, he did a minor internship in the laboratory of Pediatrics and Neurology, Radboud University, studying the deposition of heparan sulphate proteoglycans in amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease, supervised by dr. Nienke Timmer. Jan Willem did his major internship in the Department of Cellular and Molecular Medicine at the Centro de Investigaciones Biológicas in Madrid, Spain, studying the possible anti-metastatic role of the Rho GTPase inhibitor p190RhoGAP, supervised by dr. Rubén Bartolomé Conde and dr. Joaquín Teixidó. He obtained his Master's degree in Biomedical Sciences in November 2010. In February 2011, he started working on the PhD project described in this thesis in the Tumor Immunology group of the department of Immunohematology and Blood Transfusion at Leiden University Medical Center, supervised by Dr. Marieke Fransen and Prof. Dr. Ferry Ossendorp, in collaboration with Prof. dr. Clemens Löwik of the department of Radiology (now at Erasmus Medical Center in Rotterdam). Jan Willem currently works as a post-doc in the department of Medical Oncology at Leiden University Medical Center with dr. Thorbald van Hall and Prof. dr. Sjoerd van der Burg on the characterization and modulation of myeloid cells in the tumor microenvironment.

List of publications

- **Kleinovink JW**, Fransen MF, Löwik CW, Ossendorp F. Photodynamic-Immune Checkpoint Therapy Eradicates Local and Distant Tumors by CD8+ T Cells. *Cancer Immunol Res. 2017 Oct;5(10):832-838.*

- **Kleinovink JW**, van Hall T, Ossendorp F, Fransen MF. PD-L1 immune suppression in cancer: Tumor cells or host cells? *Oncoimmunology. 2017 May 12;6(7):e1325982.*

- **Kleinovink JW**, Marijt KA, Schoonderwoerd MJA, van Hall T, Ossendorp F, Fransen MF. PD-L1 expression on malignant cells is no prerequisite for checkpoint therapy. *Oncoimmunology. 2017 Feb 21;6(4):e1294299.*

- **Kleinovink JW**, van Driel PB, Snoeks TJ, Prokopi N, Fransen MF, Cruz LJ, Mezzanotte L, Chan A, Löwik CW, Ossendorp F. Combination of Photodynamic Therapy and Specific Immunotherapy Efficiently Eradicates Established Tumors. *Clin Cancer Res. 2016 Mar 15;22(6):1459-68.*

- Rahimian S, Fransen MF, **Kleinovink JW**, Amidi M, Ossendorp F, Hennink WE. Particulate Systems Based on Poly(Lactic-co-Glycolic)Acid (pLGA) for Immunotherapy of Cancer. *Curr Pharm Des. 2015;21(29):4201-16. Review.*

- Rahimian S, Fransen MF, **Kleinovink JW**, Amidi M, Ossendorp F, Hennink WE. Polymeric microparticles for sustained and local delivery of antiCD40 and antiCTLA-4 in immunotherapy of cancer. *Biomaterials. 2015 Aug;61:33-40.*

- Rahimian S, Fransen MF, **Kleinovink JW**, Christensen JR, Amidi M, Hennink WE, Ossendorp F. Polymeric nanoparticles for co-delivery of synthetic long peptide antigen and poly IC as therapeutic cancer vaccine formulation. *J Control Release. 2015 Apr 10;203:16-22.*

- Rahimian S*, **Kleinovink JW***, Fransen MF, Mezzanotte L, Gold H, Wisse P, Overkleeft H, Amidi M, Jiskoot W, Löwik CW, Ossendorp F, Hennink WE. Near-infrared labeled, ovalbumin loaded polymeric nanoparticles based on a hydrophilic polyester as model vaccine: In vivo tracking and evaluation of antigen-specific CD8(+) T cell immune response. *Biomaterials. 2015 Jan;37:469-77.* *shared first authorship

- Cruz LJ, Rosalia RA, **Kleinovink JW**, Rueda F, Löwik CW, Ossendorp F. Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8(+) T cell response: a comparative study. *J Control Release. 2014 Oct 28;192:209-18.*

- Bartolomé RA, Díaz-Martínez M, Coló GP, Arellano-Sánchez N, Torres-Ayuso P, **Kleinovink JW**, Mérida I, Teixidó. A Blk-p190RhoGAP signaling module downstream of activated Gα13 functionally opposes CXCL12-stimulated RhoA activation and cell invasion. *J. Cell Signal. 2014 Nov;26(11):2551-61.*

- Timmer NM, Herbert MK, **Kleinovink JW**, Kiliaan AJ, De Waal RM, Verbeek MM. Limited expression of heparan sulphate proteoglycans associated with Aβ deposits in the APPswe/PS1dE9 mouse model for Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol. 2010 Oct;36(6):478-86.*