



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Development of novel anti-cancer strategies utilizing the zebrafish xenograft model

Chen, Q.

Citation

Chen, Q. (2020, September 1). *Development of novel anti-cancer strategies utilizing the zebrafish xenograft model*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136271>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/136271>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136271> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Chen, Q.

Title: Development of novel anti-cancer strategies utilizing the zebrafish xenograft model

Issue Date: 2020-09-01

Nederlandse Samenvatting

Kanker is nog altijd een van de grootste doodsoorzaken wereldwijd. Chemotherapie is vaak de eerste keuze voor de behandeling van kanker, maar de bijwerkingen hiervan veranderen de normale fysiologie van cellen en hebben grote gevolgen voor kwaliteit van leven van patiënten. Vooruitgang in biomedisch onderzoek heeft laten zien dat er ook andere therapeutische mogelijkheden zijn. De overleving en verspreiding van tumorcellen kan bevorderd worden door interacties met het omliggende weefsel. Ingrijpen op dit proces is een mogelijke nieuwe behandelingsstrategie. Daarnaast zou de selectiviteit van behandelingen tegen kanker verbeterd kunnen worden door medicijnen lichtgevoelig te maken (met fotosensitizers) en door de ontwikkeling van dragers (bijvoorbeeld liposomen) die zorgen voor een specifieke medicijnafgifte. De zebrafish wordt in toenemende mate toegepast als modelorganisme bij kanker- en geneesmiddelenonderzoek. In dit proefschrift worden zebrafishembryo's gepresenteerd als een innovatief modelsysteem om de rol van macrofagen bij bloedvatontwikkeling (angiogenese) in tumoren te bestuderen. Bovendien laten wij zien dat de zebrafish een geschikt kankermodel is voor het testen van de toedieningswijze van geneesmiddelen, de condities voor activering van lichtgevoelige verbindingen, de toxiciteit voor het organisme en de effectiviteit van foto-dynamische en foto-actieve therapieën. Ten slotte hebben wij aangetoond dat licht-geïnduceerde, cel-specifieke aflevering van een in liposomen verpakt geneesmiddel (doxorubicine) de groei van humane kankercellen in de zebrafish kan remmen zonder cytotoxische bijwerkingen.

In **hoofdstuk 2** hebben we de functie van macrofagen van de zebrafish bij de xenotransplantatie van humane tumorcellen onderzocht. Eerder onderzoek van onze groep had laten zien dat tijdelijke onderdrukking van de ontwikkeling van macrofagen (door uitschakeling van de transcriptiefactor Pu.1) de angiogenese van tumoren blokkeert op de primaire locatie waar metastasering begint. In dit hoofdstuk hebben wij metronidazole gebruikt voor chemische ablatie van macrofagen in transgene zebrafishes (*Mpeg:GAL4:UAS:NTR:mCherry*) waarin huidmelanoomcellen waren getransplanteerd. We zagen dat de tumor-angiogenese was verstoord in de afwezigheid van macrofagen, terwijl in de controlegroep de macrofagen werden aangetrokken naar plaatsen van tumorgroei en daar de vorming van bloedvaten bevorderden. Er is toenemend bewijs dat lactaat als product van de glycolyse macrofagen kan aantrekken en angiogenese induceren bij sterk glycolytisch actieve kankercellen. Om deze mogelijkheid te onderzoeken hebben wij lactaat geïnjecteerd in een hersenventrikel van de zebrafish en konden aantonen dat deze stof de aantrekking van macrofagen verhoogt. Chemische remming van de glycolyse van tumorcellen met 2-Deoxyglucose (2DG) blokkeerde de uitscheiding van lactaat. Wanneer deze cellen werden getransplanteerd in zebrafishembryo's was de tumor-angiogenese verminderd, wat suggereert dat de macrofagen die door lactaat worden aangetrokken, specifieke cytokinen produceren die de angiogenese bevorderen.

In **hoofdstuk 3** valideren wij een chemische verbinding (TLD1433) voor foto-dynamische therapie (PDT)

in ectopische en orthotopische zebrawismodellen voor conjunctivaal melanoom. Eerst werd TLD1433 getest op verschillende cellijnen afgeleid van conjunctivaal melanoom (CRMM1, CRMM2, CM2005), uveaal melanoom (OMM1, OMM2.5, MEL270), epidermoïde carcinoom (A431) and cutaan melanoom (A375). De beste kandidaten (cellijnen CRMM1 en CRMM2) werden geselecteerd om de PDT-verbinding *in vivo* te testen. De maximaal getolereerde dosis van TLD1433 werd bepaald in zowel wildtype embryo's als in embryo's waarin conjunctivaal melanoomcellen (CM) getransplanteerd waren. TLD1433 werd vervolgens toegediend aan de embryo's via drie routes (in het water, intraveneus en retro-orbitaal). De CM-getransplateerde embryo's tolereerden minder TLD1433 dan wildtype embryo's. TLD1433 remde tumorgroei in het ectopische CM-model na intraveneuze en retro-orbitale toediening en in het orthotopische CM-model na retro-orbitale toediening. Deze resultaten illustreren duidelijk dat ons zebrawis-kankermodel kan worden toegepast om de toedieningsroute en de dosis van licht-geactiveerde, chemotherapeutische verbindingen te optimaliseren.

In **hoofdstuk 4** hebben wij ons gericht op een foto-activeerbare therapie (PACT) en daarbij de anti-kanker eigenschappen van een nieuw trisheteroleptisch rutheniumcomplex ($[2](PF_6)_2$) gevalideerd *in vitro* en in een zebrawisembryomodel voor CM. Het metaalcomplex $[2]^{2+}$ was op basis van eerder onderzoek ontworpen om de cellulaire opname en de licht-geïnduceerde anti-kanker activiteit te vergroten en daarbij een lage toxiciteit in het donker te behouden. De familie van rutheniumverbindingen kan door licht geactiveerd worden via een zuurstof-onafhankelijke fotosubstitutiereactie. Dit is de eerste keer dat de toxiciteit en effectiviteit van zo'n ruthenium-gebaseerd complex is getest in het zebrawiskankermodel. Verschillende toedieningswijzen werden onderzocht om een optimale balans te vinden tussen toxiciteit en therapeutisch effect. Wij vonden een hogere effectiviteit van de rutheniumverbinding in het *in vivo* orthotopische CM-model dan in het ectopische CM-model. Deze resultaten vormen een goede basis voor verder onderzoek naar de toepassing van deze nieuwe verbinding voor de lokale behandeling van CM in meer geavanceerde preklinische modellen.

In **hoofdstuk 5** hebben wij aangetoond dat de groei van getransplanteerde borstkankercellen in zebrawisembryo's geremd kan worden via een licht-geïnduceerde en cel-specifieke therapie met doxorubicine-bevattende liposomen. Wij hebben hierbij een licht-induceerbare verwijderingsmethode van het polyethyleenglycol van de liposomen onderzocht door de interactie te reguleren tussen twee peptiden (E op liposomen en K op tumorcellen) die nodig zijn voor de fusie van liposomen met celmembranen van tumorcellen en specifieke afgifte van medicijnen. Wij konden een directe fusie tussen liposomen en celmembranen van tumorcellen bewerkstelligen met het experimentele twee-componenten-systeem (fusie van peptiden E en K) evenals met een systeem van folaat-omhulde liposomen (F-liposomen) die gericht zijn op de folaatreceptor die tot overexpressie komt op getransplanteerde MDA-MB-231-cellen. Beide systemen leverden voldoende doxorubicine aan tumorcellen om tumorceldood te induceren. Omdat de liposomen en tumorcellen fluorescerend waren,

konden zij makkelijk gedetecteerd worden in de zebraisembryo's en was het mogelijk om oppervlakte en intensiteit te kwantificeren. Dit onderzoek illustreert dat het zebraiskankermodel dienst kan doen als een efficiënt platform voor optimalisatie van de toxische eigenschappen, biodistributie, stabiliteit en anti-kanker werkzaamheid van nanomedicijnen.

Concluderend, wij hebben kankermodellen gebaseerd op zebraisembryo's succesvol gebruikt om de rol van macrofagen in de micro-omgeving van getransplanteerde tumorcellen te onderzoeken. Het lactaat dat door tumorcellen wordt uitgescheiden bleek macrofagen te kunnen aantrekken en vervolgens tumor-angiogenese te induceren. Daarnaast hebben we deze zebraiskankermodellen gebruikt om PDT- en PACT-strategieën te testen. De PDT-verbinding TLD1433 en de PACT-verbinding [2](PF₆)₂ vertoonden een selectieve anti-kanker werkzaamheid. Ten slotte hebben we een cel-specifieke therapie getest waarbij liposomen worden gebruikt om de cellulaire opname van anti-kanker verbindingen te vergroten. Hierbij zijn wij erin geslaagd om doxorubicine in liposomen te verpakken en af te leveren aan tumorcellen na foto-activatie.

Bij elkaar genomen toont dit proefschrift aan dat zebraiskankermodellen uitstekend geschikt zijn voor de ontdekking van nieuwe geneesmiddelen en de potentie hebben om de ontwikkeling van nieuwe anti-kanker therapieën te versnellen.

