

NEDERLANDSE SAMENVATTING EN
DANKWOORD BEHORENDE BIJ HET
PROEFSCHRIFT:

"Suicide"

Gene Therapy

for Malignant Central Nervous System Tumors

A.J.P.E. Vincent

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt het gebruik van recombinant adenovirus-TK voor de behandeling van experimentele hersentumoren en leptomeningeale metastasen in ratten in verschillende studies onderzocht. De hoofdstukken 2,3,4 en 5 zijn gepubliceerde (of nog te publiceren) artikelen van de verschillende studies.

In hoofdstuk 1 worden verschillende methoden van genoverdracht besproken. Virale genoverdracht is zeer efficiënt in vergelijking met non-virale genoverdracht, hoewel de laatste een hoger veiligheidsprofiel heeft. De meest gebruikte non-virale methoden worden kort besproken. Daarnaast worden constructie, voordelen en nadelen van de meest gebruikte virale methoden voor genoverdracht of gentransductie kort besproken.

Hoofdstuk 2: In de experimentele genterapie worden genen ontwikkeld die coderen voor enzymen die een niet-toxische stof kunnen omzetten in een toxische stof. Het Herpes Simplex virus thymidinekinase-gen (HSV-tk), ook wel "zelfmoord gen" genoemd, wordt het meest gebruikt. Na gentransductie in de cel (door bijvoorbeeld een recombinant virus) wordt het gen via transcriptie en translatie vertaald in het thymidinekinase-enzym. Dit enzym is in staat Ganciclovir (GCV) om te zetten in een toxische nucleoside variant, GCV-trifosfaat. GCV-trifosfaat gaat DNA-verlenging tegen, wat celdood tot gevolg heeft als de cel in deling gaat. Volgens dit principe worden alleen delende cellen gedood na behandeling met GCV. Dit kan een groot voordeel zijn bij de behandeling van maligniteiten van het centrale zenuwstelsel, aangezien de meeste cellen in het centrale zenuwstelsel niet delen. Studies met recombinant virale vectoren, waarbij gebruik gemaakt is van het TK/GCV-systeem voor de behandeling van experimentele tumoren van het centrale zenuwstelsel, worden nader besproken in dit hoofdstuk.

In hoofdstuk 3 wordt de effectiviteit van gentransductie en doding van hersentumorcellen onderzocht na behandeling met het recombinant adenovirus. Om gentransductie kwalitatief aan te tonen, werden allereerst hersentumorcellen van de rat (9L) en humane hersentumorcellen (U251) *in vitro* geïnfecteerd met een recombinant adenovirus welke het markeringsgen *lacZ* bevat. Zeer efficiënte gentransductie werd waargenomen in beide cellijnen, hoewel een hogere activiteit van *lacZ*-expressie werd gevonden in humane tumorcellen. Experimentele hersentumoren bij de rat werden met hetzelfde virus geïnjecteerd. Na kleuring was in de hersencoupees macroscopisch een zeer efficiënte gentransductie waarneembaar, die met name in de tumor was gelocaliseerd. Microscopisch onderzoek van de coupes liet, behalve getransduceerde tumorcellen, ook getransduceerde hersencellen zien. Deze hersencellen hadden geen duidelijke pathologische afwijkingen. Celdoding *in vitro* werd onderzocht door hersentumorcellen

van de rat (9L) en humane hersentumorcellen (U251) te infecteren met recombinant adenovirus-TK, en vervolgens te behandelen met GCV. Zeer efficiënte doding van tumorcellen werd aangetoond in beide tumorcellijnen. Humane tumorcellen werden effectiever gedood dan tumorcellen van de rat. Om een effect *in vivo* aan te tonen, werden tenslotte ratten die een hersentumor hadden, intra-tumoraal geïnjecteerd met verschillende hoeveelheden recombinant adenovirus-TK. Vervolgens werden de ratten 10 dagen lang behandeld met GCV. De overleving van ratten die behandeld waren met GCV, was significant verlengd in vergelijking met controleratten. De verlende levensduur van de ratten was direct gerelateerd aan de hoeveelheid virus die werd ingespoten. Ratten met hersentumoren werden ook behandeld met recombinant retrovirus-TK producerende cellen. Er werd geen verschil in overleving waargenomen tussen de met recombinant adenovirus en de met recombinant retrovirus behandelde ratten. Deze recombinante virussen zijn echter niet goed vergelijkbaar. Theoretisch heeft het recombinant adenovirus voordelen boven het recombinant retrovirus, namelijk dat een celvrije oplossing direct *in vivo* kan worden geïnjecteerd, en dat ook niet-delende tumorcellen kunnen worden geïnfecteerd.

In hoofdstuk 4 wordt de effectiviteit van de behandeling van leptomeningeale metastasen met behulp van recombinant adenovirus-TK bestudeerd in een ratmodel. Allereerst werd hiervoor een ratmodel met leptomeningeale metastasen ontwikkeld, door hersentumorcellen van de rat (9L) suboccipitaal direct in de liquor te injecteren. Ratten die geïnjecteerd werden met deze cellen, ontwikkelden tumoren door het hele centrale zenuwstelsel en overleden binnen 20 dagen. Vier humane tumorcellijnen die leptomeningeaal kunnen metastaseren (A549; niet-kleincellig longcarcinoom, 518-A2; melanoom, GLC-1; kleincellig longcarcinoom), één humane glioomcellijn (U251) en één hersentumorcellijn van de rat (9L) werden *in vitro* geïnfecteerd met verschillende hoeveelheden (titers) recombinant adenovirus-luciferase om genexpressie in de tumorcellijnen na infectie te kwantificeren. Alle cellijnen lieten een hoge genexpressie zien na infectie met het recombinant virus. Om doding van tumorcellen te kwantificeren, werden dezelfde cellijnen ook geïnfecteerd met verschillende titers recombinant adenovirus-TK, gevolgd door GCV toediening. Alle tumorcellen werden zeer effectief gedood door het virus. Tevens bleek dat celdoding nog optrad tot tenminste 6 dagen na infectie, en dat humane glioomcellen (U251) per tijdseenheid effectiever werden gedood dan hersentumorcellen van de rat (9L). In de *in vivo* experimenten die in dit hoofdstuk worden beschreven, werd allereerst recombinant adenovirus-*lacZ* intrathecaal (suboccipitaal) geïnjecteerd in ratten met leptomeningeale metastasen. Het centrale zenuwstelsel werd verwijderd en gekleurd om gentransductie in leptomeningeale tumoren en in gezond weefsel te onderzoeken. Uit microscopisch onderzoek bleek dat er getransduceerde tumorcellen langs de gehele neuraxis voorkwamen. De meeste getransduceerde cellen werden waargenomen in de tumormassa dichtbij de injectie plaats.

Ook enkele ependymcellen in het spinale kanaal bleken geïnfecteerd te zijn. Deze vertoonden echter geen pathologische afwijkingen. Recombinant adenovirus-TK werd vervolgens intrathecaal geïnjecteerd in ratten met leptomenigeale metastasen. Vanaf 24 uur na injectie werden de dieren gedurende 10 dagen behandeld met GCV. Ratten die behandeld werden met TK/GCV leefden significant langer dan de controleratten.

In hoofdstuk 5 wordt de adenovirale gentransductie en de effectiviteit van celdodding door TK/GCV geëvalueerd in diverse humane cellijnen van primaire en secundaire hersentumoren.

De effectiviteit van het virus werd getest *in vitro*, en in ratten met hersentumoren of met leptomenigeale metastasen *in vivo*. Recombinante virussen waarbij transcriptie van het transgen plaatsvindt door de "major late promoter" (MLP), dan wel door "human cytomegalovirus immediate early gene promoter" (CMV), werden zowel *in vitro* als *in vivo* met elkaar vergeleken. Hierbij werd gekeken naar genoverdracht en effectiviteit van celdodding. Humane tumorcellijnen afkomstig van tumoren die kunnen metastaseren naar de hersenen (A549; niet-kleincellig longcarcinoom, 518-A2; melanoom, GLC-1; kleincellig longcarcinoom), 3 humane glioomcellijnen (U251, D384, LW5) en één glioomcellijn afkomstig van de rat (9L), werden *in vitro* geïnfecteerd met het recombinant adenovirus-*lacZ*. In alle cellijnen werd na infectie een zeer effectieve transductie met het *lacZ*-gen waargenomen. Dezelfde cellijnen werden *in vitro* geïnfecteerd met verschillende titers recombinant adenovirus-TK, en behandeld met GCV. Het virus bleek effectief cellen van alle cellijnen te doden. Het onderzoek toonde ook aan dat de verdubbelingstijd van glioomcellen direct gecorreleerd is aan de effectiviteit van celdodding *in vitro* na behandeling met TK/GCV. De MLP en CMV-promoter lieten zowel *in vitro* als *in vivo* een aantal belangrijke verschillen zien. Tumorcellen geïnfecteerd met recombinant adenovirus met de CMV-promoter waren groter van afmeting dan de cellen geïnfecteerd met de MLP-promoter. Dit zou kunnen duiden op toxiciteit. De tumorcellen werden ook significant effectiever gedood na infectie met de CMV-promoter, dan met de MLP-promoter. De CMV-promoter liet echter ook celdodding zien na infectie met adenovirus-TK zonder toevoeging van GCV. Dit wijst op toxiciteit. Bij de *in vivo* experimenten werden verschillende titers recombinant adenovirus-TK, die of de MLP-of de CMV-promoter bevatten, geïnjecteerd in ratten met leptomenigeale metastasen of met een hersentumor. Deze ratten werden vervolgens behandeld met GCV. In alle gevallen werd een significant verlengde overlevingsduur waargenomen die dosisafhankelijk was. Dit effect was het sterkst na de behandeling met de CMV-promoter.

In hoofdstuk 6 wordt de intracerebrale toxiciteit van recombinant adenovirus bestudeerd. Daarnaast wordt ook gekeken naar de systemische verspreiding van het virus na intracerebrale of intrathecale injectie.

Ratten werden intracerebraal geïnjecteerd in de rechter frontaal kwab met 10^8 of 10^9 IU (Infectious Units) recombinant adenovirus-TK, wild-type adenovirus, of PBS als controle. De ratten werden vervolgens gedurende 16 dagen behandeld met GCV, of met PBS als controle. De hersenen van alle ratten werden hierna microscopisch bekeken. In de hersenen van ratten die geïnjecteerd waren met 10^8 IU recombinant adenovirus, werd alleen milde tot matige perivasculaire lymfoïde infiltratie waargenomen in de directe omgeving van de plaats van injectie. Na injectie van 10^9 IU werd matige tot ernstige perivasculaire lymfoïde infiltratie, gliale proliferatie, oedeem en parenchymverlies van de frontaal kwab waargenomen, die zich uitbreidde naar basaal, baso-lateraal en caudaal, doch niet verder dan 2-3 mm vanaf het injectie kanaal. Een aanvullend effect van GCV-toediening na injectie van het recombinant adenovirus-TK werd niet waargenomen. Injectie van wild-type adenovirus leidde tot een geringe uitbreiding van de laesies in vergelijking met injectie van het recombinant adenovirus-TK. Systemische verspreiding van het virus werd bestudeerd na intracerebrale injectie van recombinant adenovirus met het luciferase-gen, waarmee gentransductie kwantitatief kan worden gemeten. De expressie van het transgen werd 3 en 14 dagen na intracerebrale injectie bepaald in hersenweefsel, ruggemerg, hart, long, lever, milt, darmen, nier en testes. Alleen in hersenweefsel en ruggemerg was luciferaseactiviteit meetbaar, in alle andere organen werd geen activiteit gemeten.

ALGEMENE CONCLUSIES

De studies in dit proefschrift laten zien dat in diverse cellijnen, afkomstig van maligniteiten van het centrale zenuwstelsel, een zeer effectieve gentransductie *in vitro* wordt verkregen met behulp van het recombinant adenovirus. Effectieve genexpressie werd ook aangetoond *in vivo*, in hersentumoren en leptomeningeale metastasen van de rat. Hoge effectiviteit van celdoding *in vitro* kon worden bewerkstelligd in tumorcellen van de mens en de rat. Bij ratten met hersentumoren of leptomeningeale metastasen werd een significant langere overlevingsduur bereikt na behandeling met recombinant adenovirus-TK/GCV, in vergelijking met onbehandelde controles. Transgenexpressie en effectiviteit van celdoding was zowel *in vitro* als *in vivo* dosisafhankelijk. Tevens werd aangetoond dat de promotor, die het transgen aanstuurt in het adenovirus-TK, de toxiciteit en effectiviteit van de behandeling beïnvloedt. De pathologische afwijkingen die na intracerebrale injectie van recombinant adenovirus werden gevonden, waren beperkt. Na intracerebrale of intrathecale injectie werd geen systemische transgenexpressie gemeten. Ratten gingen klinisch niet achteruit tijdens of na de behandeling met recombinant adenovirus. Deze resultaten laten zien dat de behandeling van tumoren van het centrale zenuwstelsel met recombinant adenovirus-TK en GCV een effectieve methode is. Naar aanleiding van de bevindingen in dit proefschrift is een klinische studie gewenst.

DANKWOORD

Zonder de inspanning van anderen zou dit proefschrift niet tot stand zijn gekomen. Een aantal wil ik in het bijzonder bedanken.

Allereerst mijn promotor Prof. dr C.J.J. Avezaat, voor de kans die u mij gegeven heeft om dit onderzoek te verrichten. Hoewel de moleculaire biologie ver van de neurochirurgie en de patientenzorg af staat, heeft u de vorderingen van het onderzoek altijd met veel belangstelling gevolgd. Daarbij heb ik van u tijdens mijn opleiding alle ruimte gehad om dit proefschrift af te maken. Ik ben u hiervoor zeer erkentelijk. In mijn komende opleidingsjaren hoop ik nog tijd te vinden om het neuro-oncologisch onderzoek met u verder uit te breiden.

Prof. dr D. Valerio, voor de "mooie" en leerzame onderzoeksjaren op Introgene. Als clinicus was het aanvankelijk even wennen in het wetenschappelijke wereldje. Het wetenschappelijke jargon heb ik me gelukkig snel eigen kunnen maken, waarna uiteindelijk een vruchtbare samenwerking is ontstaan. Bedankt voor de kans die je mij hebt gegeven om in jouw lab te werken. Ik hoop dat we kunnen blijven samenwerken in het neuro-oncologisch onderzoek.

Mijn co-promotor dr P.M. Hoogerbrugge wil ik bedanken voor de kritische beschouwingen van niet alleen de experimenten, maar vooral ook van mijn artikelen en proefschrift. Het was leerzaam en prettig samenwerken met een clinicus die de vraagstelling van het wetenschappelijk experiment wist te transponeren naar de kliniek.

Dr B. Bout, voor de "inwijding" in de moleculaire biologie. Het zal wel geen makkelijke klus zijn geweest om een clinicus de fijne kneepjes van het vak te leren. Ik wil je bedanken voor het geduld dat je hebt opgebracht, en voor de manier waarop je mij te allen tijde wist te stimuleren, vooral na mislukte proeven.

Zonder Juus Noteboom, Gerry van Someren en Carmen del Esandi was het proefschrift waarschijnlijk nooit tot stand gekomen. De vele hulp en toewijding bij het maken van de batches recombinant adenovirus heeft mij de gelegenheid gegeven al deze experimenten te verrichten. Bedankt voor de grote hoeveelheid werk! Hierbij wil ik ook de medewerkers van Introgene bedanken voor alle hulp en adviezen tijdens mijn onderzoek.

Dr Ch. Vecht wil ik bedanken voor het feit dat ik via hem op Introgene ben beland. Regelmatig was je op Introgene om te informeren naar de progressie van het onderzoek. Het zijn uiteindelijk twee zeer vruchtbare jaren geworden waarvan jij aan de basis hebt gestaan.

Prof. dr D.W. van Bekkum wil ik bedanken voor de vele en regelmatig heftige wetenschappelijke discussies die we hebben gevoerd tijdens en na werktijd, niet zelden met een borrel. Het enthousiasme, de daadkracht en de overgave waarmee u de wetenschap bedrijft is uniek en heeft mijn grote bewondering.

Rolf Bartstra wil ik bedanken voor de statistische berekeningen, en voor de vele wetenschappelijke discussies die merkwaardigerwijs met name over vrouwen gingen.

Maarten Driesse, Peter Sillevius Smit en Chris Zurcher wil ik bedanken voor de prettige samenwerking die heeft geleid tot diverse publicaties.

Mijn collega's, stafleden en assistenten van de afdeling neurochirurgie wil ik danken voor de soepelheid waarmee mijn afwezigheid vanwege de wetenschap de afgelopen jaren werd opgevangen. Hierbij wil ik met name noemen: Marie-Lise van Veelen, Wimar van den Brink, Henk van Santbrink en natuurlijk niet te vergeten Rashid Janjua.

Mijn paranimfen Werner Overdijk en Rolf Bartstra wil ik danken voor de vriendschap en het feit dat jullie mij ter zijde willen staan bij de verdediging van dit proefschrift.

Mijn zusje Valérie heeft mijn respect afgedwongen door eerder te promoveren dan ik. Ik erken de nederlaag. Veel geluk in Frankrijk! Mijn ouders bedank ik voor het feit dat ik besta, en dat zij mij de mogelijkheid hebben gegeven dit leven te leiden.

