

Use of non-pathogenic bacteria as vectors for targeted gene expression cancer gene therapy

Citation for published version (APA):

Mengesha Woldemicael, A. (2009). *Use of non-pathogenic bacteria as vectors for targeted gene expression cancer gene therapy*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20090401am>

Document status and date:

Published: 01/01/2009

DOI:

[10.26481/dis.20090401am](https://doi.org/10.26481/dis.20090401am)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

Ondanks de vooruitgang die wordt gemaakt in de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en ondanks verbeterde bestralingstherapieën, kan worden vastgesteld dat de effectiviteit van deze conventionele behandelingswijzen voor tumorcontrole door diverse factoren wordt gelimiteerd. Dat heeft geleid tot interesse voor en ontwikkeling van alternatieve strategieën in kankertherapie, zoals het gebruik van bacteriën die selectief tumorcellen zouden kunnen vernietigen. Het gebruik van prokaryote vectoren als selectieve kankerbehandeling is een relatief nieuw onderzoeksgebied, en de klinische effectiviteit ervan moet nog worden aangetoond. De specificiteit van de vectoren is gebaseerd op de unieke fysiologie van vaste tumoren, die vaak gekarakteriseerd wordt door de aanwezigheid van hypoxie en necrose. Er is voor verschillende niet-pathogene prokaryote stammen aangetoond dat ze na systemische toediening selectief in deze hypoxisch/necrotische regio's infiltreren en repliceren. Voor zowel *Clostridium* als *Salmonella* vectoren werd bewezen dat ze veilig kunnen worden toegediend en dat ze kunnen gebruikt worden om therapeutische eiwitten naar tumoren te transporteren. In dit werk wordt onderzoek beschreven met twee verschillende prokaryote anti-kanker vectoren. In het eerste gedeelte komt het gebruik van geattenueerde *Salmonella* spp. als vector aan bod. In het tweede gedeelte wordt het onderzoek met *Clostridium* beschreven. In het eerste gedeelte van het *Salmonella* werk, werd het potentieel bestudeerd van *in vivo* ¹⁸F-MRS om het succes van het TAPET-CD/5-FC kankertherapie systeem te voorspellen. We hebben er aangetoond dat deze techniek inderdaad kan gebruikt worden om het resultaat van dit prokaryote-gemedieerde transfersysteem te voorspellen, en dat het nuttig is om met een niet-invasieve beeldvormingstechniek de behandeling op te volgen. Daarnaast hebben we onderzocht of het mogelijk was de specificiteit van het systeem te verhogen door gebruik te maken van een induceerbaar systeem. In de eerste plaats werd een hypoxie-induceerbare promotor (HIF-1, gebaseerd op de endogene pepT promotor) geselecteerd op basis van beschikbare literatuurgegevens. Dit resulteerde *in vitro* in een ~40-voudige inductie onder hypoxische condities. Bovendien hebben we met behulp van een reporterconstruct ook in een tumormodel *in vivo* deze hypoxie-inductie gevalideerd. Vervolgens hebben we deze promotor genetisch gewijzigd om de induceerbaarheid en de flexibiliteit van het systeem te maximaliseren. Ten tweede hebben we microarray experimenten uitgevoerd met als doel genen te identificeren die in hoge mate geïnduceerd werden na blootstelling aan hypoxie of bestraling. Zo werden o.a. meer dan 45 genen geïdentificeerd die >10-voudig geïnduceerd werden in hypoxische condities. Dezelfde microarray technologie werd tenslotte ook gebruikt voor de identificatie van genen die specifiek in de tumor geïnduceerd werden, door het genomisch expressieprofiel van de *Salmonella* bacteriën geïsoleerd uit tumoren te analyseren. Onze waarnemingen tonen aan dat het gebruik van een induceerbaar systeem de selectiviteit van de *Salmonella*-gemedieerde transfer van therapeutische moleculen verbetert. Zulk een systeem kan dan ook een zinvolle uitbreiding vormen voor het klinisch gebruik van deze prokaryote vector.

In het tweede gedeelte van deze thesis, wordt het onderzoek beschreven dat we hebben uitgevoerd om het *Clostridium*-gedieerde vectorsysteem substantieel te verbeteren. In de eerste plaats hebben we een methode ontwikkeld, gebaseerd op conjugatie, die het voor het eerst mogelijk maakt om de *Clostridium* stammen met de beste tumorkoloniserende eigenschappen (e.g. *C. sporogenes*), op een efficiënte manier genetisch te wijzigen. Ten tweede, hebben we onderzocht of het mogelijk is, naar analogie met de situatie in een klinische setting, om meerdere consecutieve behandelingscycli met NTR-recombinante *C. sporogenes* bacteriën uit te voeren. In combinatie met toediening van een niet-toxische prodrug resulteerde dit in een veelbelovend aanhoudend anti-tumor effect. Tenslotte hebben we *Clostridium* ook gebruikt als vector om, naast de reeds beschreven prodrug-converterende enzymen en cytokines, antilichamen te produceren. We beschrijven dat het inderdaad mogelijk is om *Clostridium* genetisch te veranderen zodat ze een zogenaamd VHH tegen HIF-1 alpha tot expressie brengen. Deze VHH zijn afgeleid van een speciaal soort antilichaam, geïsoleerd uit kameelachtigen, waarvan de opbouw van de bindingscapaciteit wordt bepaald door één gen. *Clostridium* bracht dit VHH niet enkel tot expressie, er bleek ook dat de geproduceerde VHH's volledig functioneel waren.