

# VU Research Portal

## **In vitro studies on radiation and temozolomide in human glioma**

van Nifterik, K.A.

2011

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

van Nifterik, K. A. (2011). *In vitro studies on radiation and temozolomide in human glioma*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **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

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## **Samenvatting**

### **In vitro studies over straling en temozolomide in humane gliomas**

De mediane overleving van patienten met een glioblastoma multiforme (GBM) is de afgelopen decennia slechts marginaal verbeterd. Dit ondanks de uitgebreide zoektocht naar nieuwe medicijnen en behandelmethoden en mogelijke nieuwe combinaties hiervan. Onderzoek naar de potentie van ‘targeted’ therapie in combinatie met bestaande behandelmethoden om de behandeling van gliomas te kunnen verbeteren was de belangrijkste doelstelling van dit proefschrift. Verschillende moleculaire aangrijpingspunten in de glioma tumor cel zijn geselecteerd (Figuur 6, Hoofdstuk 1), die kunnen dienen als therapeutisch doel voor specifieke medicijnen waarbij vooral de reactie van de glioma tumor cel als gevolg van de combinatie van deze medicijnen met straling onderzocht is. Zelfs drievoudige behandelingen werden gegeven in twee van de studies door radiotherapie en het alkylerende medicijn temozolomide (TMZ) te combineren met het antiepileptische medicijn valproïne zuur (VPA) of met de cyclooxygenase-2 (COX-2) remmer meloxicam (MLC). Daarnaast worden er twee andere studies in dit proefschrift gepresenteerd. In een van deze studies is de rol van het enzym O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) onderzocht bij het voorspellen van de gevoeligheid van de tumorcellen voor TMZ door alkylering van het DNA. De andere studie maakte gebruik van genetische informatie om onderscheid te maken tussen nieuw gevormde tumoren of tumoren ontstaan door uitzaaiing.

De standaard behandeling voor patienten met een GBM bestaat uit radiotherapie gecombineerd met temozolomide. Statistische analyse laat zien dat de behandeling met chemoradiotherapie de lokale controle verbetert en bij de meerderheid van de patienten met een recidief ontstaat het recidief op enige afstand van de originele tumor. Het is niet altijd duidelijk of een verafgelegen tumor een metastase is van de originele tumor of een *de novo* GBM. Daarom worden in hoofdstuk 2 twee patienten besproken bij wie een tweede GBM was ontstaan na een relatief lange tijd en die buiten het eerdere bestralingsgebied waren gelegen. Met behulp van genetische profielen van de tumoren is bekeken of onderscheid gemaakt kon worden tussen verafgelegen recidief of tweede primaire GBM. De conclusie was dat de tweede GBM in beide patienten volgens de genetische profielen eerder een recidief was dan een onafhankelijk onstane tweede tumor. Dit suggereert dat de initiële radiotherapie onvoldoende in staat is geweest om de problemen met de migrerende tumorcellen onder controle te houden.

Hoofdstuk 3 laat de resultaten zien van een studie waarin is uitgezocht of de cytotoxische response op TMZ is geassocieerd met de expressie van het MGMT eiwit en/of met de methyleringsstatus van de promotor van het *MGMT* gen. De conclusie is dat de expressie van het MGMT eiwit beter in staat was dan de promotor methyleringsstatus van het *MGMT* gen om de reactie op TMZ te voorspellen in humane tumorcellijnen. De gevoeligheid voor TMZ was voor alle cellijnen voorspeld door middel van analyse van de eiwitexpressie van MGMT met behulp van de Western blot technique. Ook al waren kwantitatieve real-time methylerings-specifieke

PCR (qMSP; 92%) en bisulfiet sequenzen (100%) ook in staat om de gevoeligheid voor TMZ te voorspellen, het is belangrijk om deze resultaten behoedzaam te interpreteren. De resultaten behaald met qMSP golden alleen voor de glioma cellijnen en het bisulfiet sequenzen was alleen toegepast op een selecte groep van cellijnen waarvan al bekend was dat er een relatie was tussen de gevoeligheid voor TMZ en zowel de eiwitexpressiestatus van MGMT als de promotor methyleringsstatus van *MGMT* (gebaseerd op methylerings-specifieke multiplex ligatie-afhankelijke probe amplificatie (MS-MLPA) en qMSP). Bepaling van de expressie van het MGMT eiwit met behulp van Western blot analyse is daarom de bij voorkeur te verkiezen techniek om de gevoeligheid voor TMZ te voorspellen in humane tumorcellijnen.

De mogelijkheid van TMZ om cellen gevoeliger te maken voor straling is nader onderzocht en beschreven in hoofdstuk 4 door gebruik te maken van drie genetisch gekarakteriseerde langdurig gekweekte primaire humane GBM cellijnen waarbij gebruik is gemaakt van 'single-dose' en gefractioneerde  $\gamma$ -straling. De effecten van TMZ waren in ieder geval additief met die van straling en konden zelfs de effecten van straling versterken, zowel na 'single-dose' als na gefractioneerde bestraling. Het stralingsversterkende effect was echter in een cellijn alleen aanwezig na 'single-dose' en niet na gefractioneerde bestraling. De drie cellijnen die gebruikt zijn in deze studie hadden allen een gemethyleerde *MGMT* promotor en vertoonden geen detecteerbare expressie van het MGMT eiwit. Deze data wijzen erop dat het stralingsversterkende effect van TMZ onafhankelijk is van de MGMT status.

De mogelijke interactie (positief of negatief) tussen radiotherapie en TMZ (het standaard klinische behandelingen protocol) en VPA, een vaak voorgeschreven anti-epileptisch medicijn in patienten met een glioma, is onderzocht en beschreven in hoofdstuk 5. De bezorgdheid over het mogelijk tegenstrijdige effect van VPA op de werking van TMZ is niet bevestigd. In tegenstelling met de theoretische hypothese is gevonden dat VPA juist het cytotoxische effect van TMZ versterkt in zowel een TMZ gevoelige als een TMZ ongevoelige cellijn. VPA was ook in staat om het effect van straling te versterken, dit effect is mogelijk nog sterker door VPA met TMZ te combineren. Zoals eerder beschreven in hoofdstuk 4 zijn de versterkende cytotoxische effecten van TMZ op VPA en de stralingsversterkende effecten van VPA alleen en VPA met TMZ onafhankelijk van de gevoeligheid van de cellen voor TMZ, als bepaald door verschil in MGMT eiwitexpressie.

Vervolgens werd de combinatie van radiotherapie met TMZ onderzocht samen met de COX-2 remmer MLC, waarvan bekend is dat het glioma tumorcellen gevoeliger kan maken voor straling, zoals beschreven in hoofdstuk 6. Een voorbehandeling met TMZ zorgde voor een significant sterker cytotoxisch effect door MLC in drie geteste cellijnen. De gecombineerde behandeling van TMZ met MLC is in staat om het effect van straling aanzienlijk te versterken, alhoewel alleen de D384 cellen profiteren van de drievoudige ten opzichte van de tweevoudige behandeling. Ook hier is de versterking van het cytotoxische effect van TMZ op MLC en de versterking van de stralingsgevoeligheid door TMZ met MLC niet afhankelijk van de gevoeligheid voor TMZ aangezien alle drie de cellijnen gevoelig waren voor TMZ en geen expressie van het MGMT eiwit gedetecteerd was.

In het algemeen kan de conclusie worden getrokken dat behandeling met een combinatie van meerdere modaliteiten waaronder radiotherapie en TMZ met een of meerdere 'targeting' drugs therapeutisch voordeel kan opleveren in glioma tumorcellen. Verder onderzoek naar de onderliggende mechanismen is echter nog steeds nodig.