



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Osteosarcoma : searching for new treatment options

Baranski Madrigal, Z.

Citation

Baranski Madrigal, Z. (2016, May 26). *Osteosarcoma : searching for new treatment options*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/39707>

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/1887/39707>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/39707> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Baranski Madrigal, Z.

Title: Osteosarcoma : searching for new treatment options

Issue Date: 2016-05-26

SAMENVATTING

Osteosarcoom: de zoektocht naar nieuwe behandelingen

Osteosarcoom is de meest voorkomende hooggradige primaire kwaadaardige bot tumor. De tumor ontstaat waarschijnlijk uit mesenchymale stamcellen die de mogelijkheid hebben tot vorming van botweefsel. De incidentie is jaarlijks drie gevallen op één miljoen mensen, voornamelijk kinderen, adolescenten en mensen ouder dan 50 jaar.

Op dit moment bestaat de behandeling uit pre-operatieve chemotherapie gevolgd door chirurgische verwijdering van de tumor. De meest effectieve chemotherapeutica die systemisch werken zijn cisplatine, doxorubicine en methotrexaat. Ondanks intensieve studies naar de optimale strategie om chemotherapeutica te combineren, zijn de algemene vijfjaarsoverlevingskansen niet boven de 70% gestegen. Daarbij hebben 30-45% van de patiënten tumoren die niet reageren op chemotherapie.

Het doel van deze thesis was om nieuwe therapeutische opties voor osteosarcoom patiënten te ontdekken. Ik heb me daarbij gericht op het vinden van mogelijke genen en farmaceutische remmers die humane osteosarcoom cellen kunnen doden of gevoeliger maken voor doxorubicine.

In **Hoofdstuk 2** heb ik Aven bestudeerd, een adapter eiwit waarvan gedacht wordt dat het een rol speelt in anti-apoptotische signalering en DNA schade respons. De expressie van Aven is omgekeerd gecorreleerd met metastasevrije overleving in osteosarcoom patiënten, en is verhoogd in metastases vergeleken met primaire tumoren. In tumorcellen induceert het uitschakelen van Aven een G2 celcyclus arrest. De hoeveelheid Chk1 eiwit is verlaagd en na chemotherapie en het uitschakelen van Aven was de ATR-Chk1 DNA schade respons volledig verdwenen. Dit terwijl de activering van ATM, Chk2 en p53 intact bleef. Omdat het niet mogelijk is om de functie van Aven te remmen, heb ik onderzocht of farmacologische remming van de Aven-gecontroleerde ATR-Chk1 respons osteosarcoom cellen gevoeliger kon maken voor doxorubicine. Om dit te bereiken heb ik in 2D en 3D kweeksystemen farmacologische remmers getest die zich richten op de functie van Chk1/Chk2 of selectief zijn voor Chk1. Gelijktijdige behandeling in beide kweeksystemen leidde tot effectieve sensitivering voor chemotherapie. Gezamenlijk impliceren deze vindingen dat Aven een rol speelt in ATR-Chk1 signalering en wijzen naar inhibitie van Chk1 functie als een strategie om humane osteosarcomen gevoeliger te maken voor chemotherapie.

Om essentiële regulatoren van cel overleving te identificeren heb ik een siRNA screen uitgevoerd, die zich richtte op de Bcl2 eiwitfamilie, in **Hoofdstuk 3**. Het uitschakelen van het anti-apoptotische eiwit Bcl-xL, maar ook het uitschakelen van het pro-apoptotische eiwit Bak zorgde voor minder levensvatbaarheid van de cellen. Het uitschakelen van Bak blokkeerde het proces van de celcyclus en induceerde autofagie. Daarentegen induceerde het uitschakelen van Bcl-xL apoptotische celdood. Klinische osteosarcoom samples lieten expressie van Bcl-xL zien, maar de hoeveelheid mRNA of eiwit correleerde niet significant met de respons op therapie of overlevingskans. Desalniettemin, farmaceutische inhibitie van Bcl-xL verhoogt op een synergistische manier de respons op doxorubicine. Inderdaad, in osteosarcoma cellen met sterke expressie van Bcl-xL, verhoogde een selective Bcl-xL BH3 mimetic (WEHI-539) in combinatie met lage doses doxorubicine apoptose sterk. Deze resultaten identificeren Bcl-xL als kandidaat target gen voor nieuwe medicijnen, die in combinatietherapie de osteosarcoom in patienten gevoeliger zou kunnen maken voor de chemotherapie.

In **hoofdstuk 4** heb ik een kinase remmer screen in twee osteosarcoom cellijnen uitgevoerd waaruit drie MEK1/2 remmers (Trametinib, AZD8330 & TAK-733) interessant bleken te zijn. Deze remmers werden verder gevalideerd door gebruik te maken van zes osteosarcoom cellijnen, waaronder drie gevoelige cellijnen en drie ongevoelige cellijnen. Western Blot analyse liet zien dat met name in de gevoelige cellijnen ERK-activering verhoogd was. Bovendien bevestigden experimenten waarin de cellijnen in een 3D system werden gekweekt en vervolgens blootgesteld werden aan de remmers het effect dat aanvankelijk in 2D celkweek systemen werd gezien. Om verschillen in genexpressie tussen gevoelige en ongevoelige cellijnen te identificeren, werd een genexpressie analyse uitgevoerd. Daaruit bleek dat activering van de AKT signaalcascade vooral bij ongevoelige cellijnen voorkwam. Ten slotte, het remmen van MEK1/2 vormt een mogelijk behandelingstrategie bij osteosarcomen die een hoog niveau van MEK activatie hebben, wat bepaald kan worden door de fosforyleringsstatus van ERK.

Hoofdstuk 5 richt zich op de effecten van drie Src-remmers (Dasatinib, Bosutinib & Saracatinib) op de levensvatbaarheid en migratie van osteosarcomen in 2D, en voor validatie ook in 3D kweeksystemen. De expressie en activiteit van de cytoplasmatische kinase Src is gecorreleerd met klinische fase en overlevingskans. Alle remmers werden in combinatie met doxorubicine getest, wat tot een vermindering van de IC50 voor doxorubicine leidde. Desalniettemin, alleen behandeling met dasatinib leidde tot activatie van caspase3/7 en verminderde activering van Src. In 3D extracellulaire matrix (ECM) kweeksystemen verhinderden alledrie de remmers levensvatbaarheid, maar het vormen van netwerken van vertakkingen werd uitsluitend geremd door dasatinib in combinatie met doxorubicine. De

activiteit van focal adhesie kinase (FAK), een substraat van Src dat belangrijk is voor celmigratie, toonde uitsluitend gevoeligheid voor dasatinib. Daarbovenop werd celmigratie in 3D ECM-ingebiede sferoïde kweeksystemen alleen geremd door dasatinib terwijl de andere remmers er geen of alleen gedeeltelijk effect op hadden. Als geheel wijzen deze resultaten erop dat dasatinib ertoe in staat is om apoptose in combinatie met chemotherapie te verhogen en wellicht metastatische verspreiding in osteosarcoom patiënten te verhinderen.

Samengevat, het hier beschreven onderzoek heeft vier potentiële mogelijkheden voor de behandeling van osteosarcoom opgeleverd. Deze studies vormen de basis voor eventuele dierproeven, die uiteindelijk naar een klinisch relevante oplossing kunnen worden vertaald.