



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Chondrosarcoma models : understanding chemoresistance mechanisms for use in targeted treatment

Oosterwijk, J.G. van

Citation

Oosterwijk, J. G. van. (2013, November 19). *Chondrosarcoma models : understanding chemoresistance mechanisms for use in targeted treatment*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22281>

Version: Corrected 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/1887/22281>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22281> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Oosterwijk, Jolieke Gerdy van

Title: Chondrosarcoma models : understanding chemoresistance mechanisms for use in targeted treatment

Issue Date: 2013-11-19

Chapter 10

Nederlandse Samenvatting

I. De brug van basaal onderzoek naar therapie

Het chondrosarcoom is een kwaadaardige kraakbeenvormende tumor in het bot en na het osteosarcoom de meest voorkomende kwaadaardige bontumor in de mens. Chondrosarcomen zijn resistent tegen conventionele radio- en chemotherapie. In **hoofdstuk 1** wordt het belang van translationeel onderzoek naar chondrosarcomen beschreven. Modelsystemen zijn noodzakelijk om resultaten die gevonden zijn in het laboratorium te vertalen naar patiënten en indien mogelijk nieuwe therapieën te ontwikkelen. De toepassing van modelsystemen en het belang van de juiste vertaling van de resultaten wordt beschreven in **hoofdstuk 2**, waar ook recente resultaten in pre-klinisch onderzoek naar chondrosarcomen worden toegelicht. Uit onderzoek wordt de rol van EXT en IDH mutaties in tumorgenese, alsook de mogelijkheden voor een gerichte therapie, duidelijk. In dit proefschrift wordt de ontwikkeling van twee modelsystemen, zowel *in vitro* (cellijnen, 2D and 3D kweken) als *in vivo* (orthotopische muismodellen) beschreven, om het onderzoek naar nieuwe behandelmethoden voor chondrosarcomen te ondersteunen. Deze modelsystemen werden vervolgens gebruikt om de rol van apoptose- en overlevings signaaltransductiecascade in chemoresistentie te bestuderen. Aangezien het translationeel onderzoek zich richt op de patiënt, is het verzamelen van tumor materiaal (ingevroren, in paraffine of in celkweken) zeer belangrijk. Ingevroren materiaal kan worden gebruikt voor DNA, RNA en eiwit analyse. In paraffine bewaard weefsel kan worden gebruikt voor immunohistochemische analyse. Wanneer tissue micro-arrays (een paraffineblokje waarin meerdere kleine stukjes tumor van verschillende patienten worden geplaatst) worden gemaakt (**hoofdstuk 6-8**), kan gelijktijdig de immunohistochemische analyse van meerdere weefsels worden uitgevoerd. Het verzamelen van cellen voor celkweken en het gebruik van cellijnen (**hoofdstuk 3**) zijn essentieel voor het translationele onderzoek naar chondrosarcomen. Het *in vitro* gedrag van tumorcellen kan worden bestudeerd in 2D en 3D kweken (**hoofdstuk 5**) evenals de reactie op medicijnen (**hoofdstuk 5-8**). Daarnaast kunnen stabiele cellijnen worden gebruikt voor injectie in muismodellen (**Hoofdstuk 4**) om xenograften te creëren. Deze *in vivo* modellen maken het mogelijk om het effect van medicijnen te beoordelen waarbij rekening kan worden gehouden met omgevingsfactoren. Indien een behandeling veilig en effectief blijkt in muismodellen kan het resultaat gebruikt worden voor de ontwikkeling van klinische studies. Hiermee wordt de kans op succes verhoogd. Aangezien chondrosarcomen zeldzaam zijn is het alleen dankzij Europese netwerken zoals EuroBoNet en EuroSARC mogelijk studies met grotere patientenpopulaties uit te voeren.

II. Cellijnen als modelsysteem om chondrosarcomen te onderzoeken

Om representatieve modellen te ontwikkelen, waarbij de grote verscheidenheid aan chondrosarcomen recht wordt gedaan, wordt in **hoofdstuk 3** beschreven hoe het

bestaande cellijn-panel voor chondrosarcomen kan worden uitgebreid. Het kweken van chondrosarcoom cellen is lastig en leidt vaak tot een overmaat aan fibroblasten. Bij het begin van het onderzoek beschreven in dit proefschrift stonden vier stabiele chondrosarcoom cellijnen ter beschikking, welke allen afkomstig waren van conventionele centrale chondrosarcomen. Gedurende het onderzoek werd een additionele cellijn afkomstig van conventioneel centraal chondrosarcoom gegenereerd en tevens twee cellijnen afkomstig van gedifferentieerd chondrosarcoom. Daarnaast werden zes cellijnen ontwikkeld door andere onderzoeksgroepen (1). Deze cellijnen zijn representatief voor de genetische verscheidenheid van chondrosarcomenaangezien drie cellijnen IDH1 mutaties laten zien, twee cellijnen IDH2 mutaties en vijf TP53 mutaties. Bovendien treedt bij alle cellijnen onderdrukking van p16 op (**hoofdstuk 3, tabel 3**). Het belang van een set cellijnen die representatief is voor de verscheidenheid van chondrosarcomen wordt duidelijk gemaakt in zowel **hoofdstuk 7** als **hoofdstuk 8**. In **hoofdstuk 7** wordt beschreven dat cellijnen met TP53 mutaties gevoeliger zijn voor tyrosine kinase inhibitie in combinatie met doxorubicine dan cellijnen zonder TP53 mutaties. **Hoofdstuk 8** beschrijft het verschil in receptor tyrosine kinase activering tussen de verschillende cellijnen. Zo was bijvoorbeeld alleen de cellijn SW1353 bijzonder gevoelig voor MEK-inhibitie hetgeen verklaard kan worden uit de aanwezigheid van een NRAS mutatie. Deze mutatie was ook aanwezig in 12% van de conventionele centrale chondrosarcomen. Deze resultaten benadrukken het belang van een brede en uitgebreide set van cellijnen welke representatief zijn voor de onderlinge verschillen tussen de chondrosarcoom cellijnen.

III. Orthotopische muis modellen ter bestudering van chondrosarcomen

Hoewel cellijnen informatie kunnen verschaffen over het gedrag van tumorcellen, moet men voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische mogelijkheden ook rekening houden met de invloed van de omgeving op de tumorcel. De natuurlijke omgeving voor chondrosarcomen is het bot. De relatie tussen gezond weefsel en de tumorcel en de invloed van bloedtoevoer en het immuunsysteem op de ontwikkeling van tumorcellen kan echter niet worden bestudeerd bij het gebruik van cellijnen. Een betrouwbaar muismodel voor het menselijke chondrosarcoom is noodzakelijk om antwoorden te krijgen over de relatie tussen *in vivo* tumor gedrag en de respons op specifieke behandelingsmethoden. Tevens kan het een brug slaan tussen cellijn onderzoek en klinische studies.

In **hoofdstuk 4** wordt de ontwikkeling van een dergelijk orthotopischmuismodel beschreven. Hiervoor werden een graad II cellijn, met IDH2 en TP53 mutaties, en een graad III cellijn, wild type voor IDH en TP53, gebruikt. Luciferasegetransformeerde cellijnen werden in de tibiae geïnjecteerd. Hierdoor kon de groei van de tumor in het bot gemonitord worden gedurende het beloop van het experiment.

IV. Apoptose signaaltransductie cascade in conventionele en zeldzame vormen van chondrosarcomen

Hoofdstuk 5 beschrijft hoe 2D en 3D modellen kunnen worden gebruikt om de onderliggende oorzaken van chemoresistentie in conventionele chondrosarcomen te onderzoeken. Als eerste is aangetoond dat de resistentie niet afhankelijk is van de extracellulaire matrix of van de multidrug resistentiepompen. Aangezien de literatuur een hoge activiteit van de anti-apoptotische eiwitten Bcl-2 en Bcl-w in hooggradige conventionele chondrosarcomen laat zien, is de rol van Bcl-2 eiwitten verder onderzocht in cellijnen met behulp van de Bcl-2 remmer ABT-737. Tussentijdse combinatie behandeling, gebruik makend van doxorubicine of cisplatine, liet een dramatische reductie in de gebruikte concentraties zien en veroorzaakte apoptose in alle gebruikte cellijnen. Dit toont aan dat Bcl-2 anti-apoptotische eiwitten belangrijk zijn in chemoresistentie en dat inhibitie van Bcl-2 eiwitten chondrosarcoom cellen gevoelig maakt voor behandeling met traditionele chemofarmaca.

In **hoofdstuk 6** werd onderzocht of de eiwitexpressie van de verschillende zeldzame subtypes (gedifferentieerd, mesenchymaal, en clear cell chondrosarcoom) overeenkwam met de verschillende stadia van de groeiplaat. Voor dit doeleinde is een tissue microarray (een paraffineblokje waarin meerdere kleine stukjes tumor van verschillende patiënten worden geplaatst) gemaakt. In tegenstelling tot de verwachting, kwam de expressie van de eiwitten in de verschillende subtypes niet overeen met de verschillende stadia in de groeiplaat waarmee ze morfologisch overeenkwamen. In alle subtypes werd sterke expressie van de anti-apoptotische Bcl-2 eiwitten gevonden, suggestief voor een specifieke opregulatie van anti-apoptotische eiwitten in chondrosarcomen, onafhankelijk van subtype. Van één van de zeldzame subtypes, gedifferentieerd chondrosarcoom, waren twee cellijnen beschikbaar. Combinatie behandeling met ABT-737 en doxorubicine of cisplatine liet een reductie in cel activiteit zien, wat wijst op eenzelfde resistentie mechanisme als in conventioneel chondrosarcoom. De overeenkomst die werd geobserveerd in de reactie op combinatie van Bcl-2 eiwit inhibitie en chemotherapie met betrekking tot een stop in cel proliferatie, suggereert dat deze strategie een sterke therapeutische kandidaat is voor de behandeling van chondrosarcomen.

V. Overlevings signaaltransductie cascade in conventionele chondrosarcomen

In de hoofdstukken 7 en 8 wordt onderzocht in hoeverre toegenomen kinase activiteit bijdraagt aan de overlevingskansen van chondrosarcoom cellen en eventuele resistentie tegen chemotherapie. Eerder is beschreven dat de Src signaaltransductie cascade actief is in het chondrosarcoom (2) en de rol van dit mechanisme bij chemoresistentie wordt bestudeerd in **hoofdstuk 7**. Aangezien TP53 mutaties eveneens een rol spelen bij chemoresistentie (3;4) is ook

onderzocht in hoeverre deze mutaties de respons op therapie beïnvloeden. Cellijnen met gemuteerd TP53 bleken extra gevoelig voor de combinatie van doxorubine met Src inhibitie door middel van dasatinib (Src inhibitie). Het is echter aangetoond dat monotherapie met dasatinib ook in staat is chemoresistentie te overwinnen in andere kwaadaardige tumoren, ondanks TP53 mutaties (5;6). Dus ook in het chondrosarcoom kunnen mechanismen actief zijn die met behulp van dasatinib geblokkeerd kunnen worden. Tevens werd gevonden dat Src inhibitie de migratie blokkeert bij alle gebruikte cellijnen, hetgeen suggereert dat migratie en chemoresistentie volgens verschillende mechanismen verlopen.

In **hoofdstuk 8** is het panel van chondrosarcoom cellijnengebruikt om de activatie van tyrosine-kinase receptoren (RTK) te onderzoeken, welke de onderlinge verschillen tussen de verschillende cellijnen bevestigde. Daarnaast werd door mutatie analyse aangetoond dat één cellijn een NRAS mutatie bevatte (SW1353), welke kon worden bevestigd in 12% van de conventionele chondrosarcomen.

Ondanks verschillen in RTK activatie lieten alle cellijnen activatie van PI3K/mTOR zien. Activatie van het mTOR mechanisme kon worden aangetoond in 69% van de conventionele en 44% van de gededifferentieerde chondrosarcomen. Zowel bij het gebruik van cellijnen als bij muismodellen werd aangetoond dat de tumorgroei succesvol kan worden afgeremd door het gebruik van PI3K/mTOR inhibitoren.

In 2D celkweken bleek een gecombineerde aanpak van PI3K/mTOR remmers met MEK remmers het meest effectief, in het bijzonder in NRAS gemuteerde cellen. Echter, zowel in dit onderzoek als uit de literatuur blijkt dat bij RAS mutaties dit niet tot apoptose leidt.

VI. Mogelijkheden voor nieuwe therapeutische strategieën

Het is gebleken dat de mechanismen voor chemoresistentie in chondrosarcomen complex zijn. In dit proefschrift worden de rol van apoptose- en de overlevings signaaltransductie cascades in chemoresistentie onderzocht. In alle bestudeerde cellijnen leidde blokkering van Bcl-2 in combinatie met chemotherapie tot een duidelijke afname van de celgroei. Src-inhibitie door middel van dasatinib was met name succesvol in cellijnen met een TP53 mutatie indien dit gecombineerd werd met doxorubicine. Daarnaast werd aangetoond dat in alle cellijnen de PI3K/mTOR signaaltransductie cascade geactiveerd is, welke gebruikt kon worden om de verscheidenheid van de RTK activering te omzeilen. Bovendien laten voorlopige data zien dat mTOR afremming in combinatie met doxorubicine de mogelijkheid biedt om chemoresistentie te overwinnen (van Oosterwijk et al, ongepubliceerde resultaten). Dit biedt daarmee een derde mogelijkheid voor de behandeling van het inoperabele chondrosarcoom. Het belang van Bcl-2, Src-kinase en het PI3K/mTOR mechanisme als mogelijke aangrijpingspunten voor behandeling is daarmee aangetoond. Daarnaast kan op basis van *in-vitro* studies worden geconcludeerd dat

een combinatie van middelen succesvol kan zijn, met name in die gevallen waar één van de geactiveerde routes de cel gevoeliger maakt voor chemotherapie.

VII. Toekomstmogelijkheden

Het orthotopische muismodel (**hoofdstuk 4**) kan worden gebruikt om *in vivo* de effectiviteit te onderzoeken van de combinatie van behandelmethoden die als mogelijke kandidaten uit *in vitro* onderzoek naar voren gekomen zijn. Toekomstig onderzoek kan zich dan richten op duale PI3K/mTOR inhibitie in combinatie met MEK afremming. Dit proefschrift laat de therapeutische mogelijkheden van zowel PI3K/mTOR gecombineerd met MEK-remmers (**hoofdstuk 8**) alsook van Bcl-2 inhibitors zien (**hoofdstuk 5 en 6**). Recent is aangetoond dat een benadering waarbij deze therapieën gecombineerd worden leidt tot apoptose in cellen met RAS-mutaties (7).

In het laatste jaar van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is nog een "synthetic lethal siRNA screen", gebruik makend van doxorubicine en cis-platina, geoptimaliseerd en uitgevoerd om verdere opheldering van de rol van de apoptose- en de overlevings signaaltransductie cascade bij chemoresistentie te verkrijgen. Hierbij is gebruik gemaakt van de Dharmacon bibliotheek (ca 80 apoptose genen en ca 800 kinases). Verwacht wordt dat op basis van deze screening het mogelijk zal zijn om de belangrijkste componenten voor de beschreven mechanismen te identificeren, wat tot een beter begrip van de onderliggende factoren zal leiden. In de toekomst zal deze methode ook worden gebruikt om de resistentie voor radiotherapie in het chondrosarcoom te onderzoeken. Dit kan dan inzicht geven in de resistentie voor radiotherapie en of dit op dezelfde mechanismen berust of dat hier een heel ander mechanisme een rol speelt. In de komende periode zullen de resultaten van apoptose en kinase screening gevalideerd moeten worden door middel van short hairpin RNAs (shRNA). Doormiddel van het introduceren van shRNA in een cel kan specifiek gen expressie worden onderdrukt. Hiermee geïdentificeerde targets kunnen vervolgens met gebruik van de pijplijn beschreven in dit proefschrift gevalideerd worden. In combinatie met de hier beschreven resultaten wordt hopelijk snel een weg gebaad naar implementatie van doelgerichte therapie voor inoperabel of gemetastaseerd chondrosarcoom.

Referenties

- (1) Monderer D, Luseau A, Bellec A, David E, Ponsolle S, Saiagh S, Bercegeay S, Piloquet P, Denis MG, Lode L, Redini F, Biger M, Heymann D, Heymann MF, Le BR, Gouin F, Blanchard F. New chondrosarcoma cell lines and mouse models to study the link between chondrogenesis and chemoresistance. *Lab Invest* 2013 August 19.
- (2) Schrage YM, Briaire-de Bruijn IH, de Miranda NFCC, van Oosterwijk JG, Taminau AHM, van Wezel T, Hogendoorn PCW, Bovée JVMG. Kinome profiling of chondrosarcoma reveals Src-pathway activity and dasatinib as option for treatment. *Cancer Res* 2009;69(15):6216-22.
- (3) Donzelli S, Fontemaggi G, Fazi F, Di AS, Padula F, Biagioni F, Muti P, Strano S, Blandino G. MicroRNA-128-2 targets the transcriptional repressor E2F5 enhancing mutant p53 gain of function. *Cell Death Differ* 2012;19(6):1038-48.
- (4) Huang Y, Jeong JS, Okamura J, Sook-Kim M, Zhu H, Guerrero-Preston R, Ratovitski EA. Global tumor protein p53/p63 interactome: making a case for cisplatin chemoresistance. *Cell Cycle* 2012;11(12):2367-79.
- (5) Bosco R, Rabusin M, Voltan R, Celeghini C, Corallini F, Capitani S, Secchiero P. Anti-leukemic activity of dasatinib in both p53(wild-type) and p53(mutated) B malignant cells. *Invest New Drugs* 2012;30(1):417-22.
- (6) Amrein L, Hernandez TA, Ferrario C, Johnston J, Gibson SB, Panasci L, Aloyz R. Dasatinib sensitizes primary chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to chlorambucil and fludarabine in vitro. *Br J Haematol* 2008;143(5):698-706.
- (7) Tan N, Wong M, Nannini MA, Hong R, Lee LB, Price S, Williams K, Savy PP, Yue P, Sampath D, Settleman J, Fairbrother WJ, Belmont LD. Bcl-2/Bcl-xL Inhibition Increases the Efficacy of Mek Inhibition Alone and in Combination with PI3 Kinase Inhibition in Lung and Pancreatic Tumor Models. *Mol Cancer Ther* 2013.

