



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeting chondrosarcoma and osteosarcoma cell metabolism : the IGF pathway and beyond

Peterse, E.F.P.

Citation

Peterse, E. F. P. (2018, June 13). *Targeting chondrosarcoma and osteosarcoma cell metabolism : the IGF pathway and beyond*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62776>

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/1887/62776>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/62776> holds various files of this Leiden University dissertation

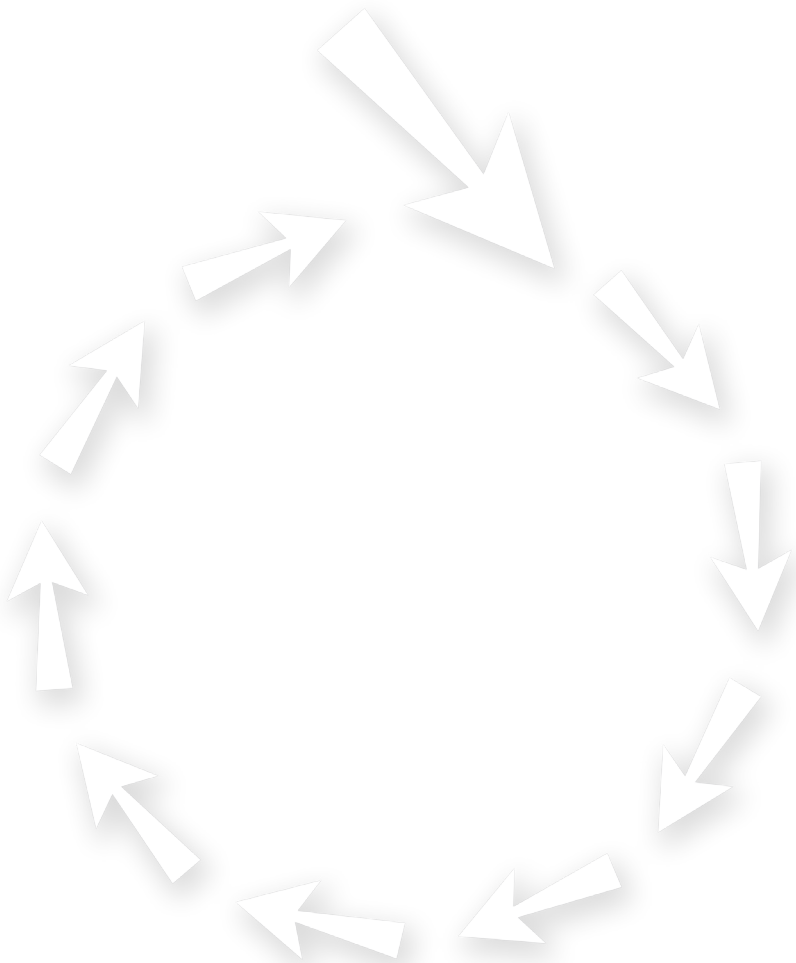
Author: Peterse, Elisabeth

Title: Targeting chondrosarcoma and osteosarcoma cell metabolism : the IGF pathway and beyond

Date: 2018-06-13

Chapter 9

**Nederlandse samenvatting
Curriculum Vitae
List of publications
Acknowledgements**



Nederlandse samenvatting

Het osteosarcoom en het chondrosarcoom zijn de meest voorkomende kwaadaardige primaire bontumoren. Osteosarcomen komen met name op jonge leeftijd voor, terwijl chondrosarcomen het meest voorkomen tussen de 30 en de 60 jaar. Chondrosarcomen kunnen alleen curatief behandeld worden als deze nog niet uitgezaaid zijn en de volledige tumor door middel van chirurgie verwijderd kan worden. Sinds de introductie van chemotherapie in de jaren '80 is de 5-jaars overleving van osteosarcoom patiënten gestagneerd op 65–70%. Het doel van de studies beschreven in dit proefschrift is het identificeren van signaaltransductieroutes die aangrijpingspunten zouden kunnen zijn voor nieuwe doelgerichte therapieën voor de behandeling van osteosarcomen en chondrosarcomen. **Hoofdstuk 1** introduceert het osteosarcoom en het chondrosarcoom, en signaaltransductieroutes die mogelijk een aangrijpingspunt voor doelgerichte therapieën zouden kunnen zijn.

Doelgerichte therapieën voor de behandeling van osteosarcomen

In de laatste vijf jaar is er een enorme toename geweest in het aantal wetenschappelijke publicaties over *in vitro* studies naar het osteosarcoom. Aan de ene kant is dit gewenst, omdat deze studies mogelijk kunnen leiden tot het identificeren van nieuwe therapieën voor de behandeling van deze dodelijke ziekte. Aan de andere kant heeft een verhoging van het aantal studies met lage kwaliteit voornamelijk negatieve consequenties omdat het een verspilling is van tijd en financiële middelen. In **hoofdstuk 2** is het aantal *in vitro* onderzoeken naar het osteosarcoom, gepubliceerd tussen 1996 en 2015, systematisch geanalyseerd. Deze analyse toont een bijna exponentiele toename van het aantal publicaties in de afgelopen jaren. Helaas heeft de meerderheid van deze studies weinig wetenschappelijke waarde omdat ze een bedenkelijke studieopzet hebben. Veel van deze studies hebben slechts gebruik gemaakt van één of twee cellijnen (U-2 OS of MG-63), terwijl het voor *in vitro* onderzoek naar osteosarcomen essentieel is om een grotere hoeveelheid cellijnen te gebruiken om de heterogeniteit van osteosarcoom patiënten na te kunnen bootsen. Daarnaast was van ongeveer een derde van de

onderzochte medicijnen niet bekend wat ze precies doen op cellulair niveau. De enorme toename van *in vitro* onderzoek naar het osteosarcoom betreft een stijging van het aantal publicaties van Chinese instituten. Deze toename kan verklaard worden door de snelgroeiende Chinese economie in combinatie met het evaluatiesysteem van Chinese artsen. In China wordt namelijk de Science Citation Index gebruikt als belangrijkste indicator voor de evaluatie van een medische carrière, waardoor er een enorme druk is om artikelen te publiceren. 53% van de *in vitro* onderzoeken naar het osteosarcoom in 2015 werd gepubliceerd door Chinese instituten. De toename in het aantal publicaties van Chinese instituten beperkt zich niet tot studies naar het osteosarcoom, maar de toename in dit veld is relatief hoog ten opzichte van andere onderzoeksvelden. Dit kan waarschijnlijk verklaard worden doordat osteosarcoom cellijnen erg makkelijk en snel groeien. Samenvattend schetst hoofdstuk 2 de huidige trend in het aantal *in vitro* studies naar het osteosarcoom. De exponentiele groei in het aantal *in vitro* studies naar het osteosarcoom onderschrijft dat het evaluatiesysteem voor medisch onderzoek moet veranderen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de analyse van genexpressie in osteosarcoom cellen met als doel het vinden van nieuwe doelgerichte therapieën voor de behandeling van osteosarcomen. mRNA expressieniveau's werden vergeleken tussen osteosarcoom cellen en voorlopercellen van het osteosarcoom. De genen die betrokken zijn bij de insuliegroefactor (IGF) signaaltransductieroute, die een rol speelt bij botgroei, bleken verschillend tot expressie te komen. De genen *IGFBP4* en *GAS6* waren het sterkst gedownreguleerd in de osteosarcoom cellen. Beide coderen voor negatieve regulatoren van de IGF1 receptor (IGF1R). Dit zou kunnen duiden op een verhoogde activiteit van de IGF signaaltransductieroute. Op basis van dit gegeven veronderstellen wij dat de groei van osteosarcomen onderdrukt zou kunnen worden door deze signaaltransductieroute te remmen. Osteosarcoom cellijnen werden daarom behandeld met OSI-906, een inhibitor van zowel de IGF1R als de insulinereceptor (IR). Het is essentieel om beide receptoren te remmen om resistentie tegen IGF1R remmers te voorkomen. OSI-906 remde de groei van drie van de vier geteste osteosarcoom cellijnen. Daarnaast resulteerde de behandelingen met OSI-906 in een verminderde fosforylering van het insulinereceptorsubstraat 1 (IRS1). Dit toont aan dat het

effect van OSI-906 op de cellen specifiek veroorzaakt wordt door het remmen van de IGF signaaltransductieroute. Derhalve identificeert de studie beschreven in hoofdstuk 3 de IGF signaaltransductieroute in osteosarcomen als mogelijk aangrijpingspunt voor therapie.

Hoofdstuk 4 betreft een beschouwing van de studie van Yang en collega's. Vergelijkbaar met onze studie die beschreven is in hoofdstuk 3, vergeleek deze studie ook genexpressiedata tussen osteosarcoom cellen en voorlopercellen van het osteosarcoom. In lijn met onze resultaten vond deze studie ook een downregulatie van negatieve regulatoren van de IGF signaaltransductieroute. In het eerste gedeelte van deze beschouwing wordt beschreven wat de huidige stand van zaken is met betrekking tot de mogelijkheid om de IGF signaaltransductieroute te remmen als behandeling van osteosarcomen. Preklinische modellen suggereren dat de IGF signaaltransductieroute een mogelijk aangrijpingspunt voor therapie zou kunnen zijn. Echter, de resultaten van klinische studies laten zien dat maar een kleine groep patiënten mogelijk baat heeft van behandeling met IGF1R remmers, en daarom zijn farmaceutische bedrijven gestopt met de productie van medicijnen die de IGF signaaltransductieroute remmen. In het tweede gedeelte wordt beschreven hoe er voor gezorgd kan worden dat in de toekomst remmers van de IGF signaaltransductieroute toch mogelijk gebruikt kunnen worden in de kliniek. Biomarkers dienen geïdentificeerd te worden die patiënten kunnen selecteren waarin het remmen van de IGF signaaltransductieroute wel effectief is. Daarnaast moeten studies gedaan worden met medicijnen die simultaan de IGF1R en de IR remmen; de klinische studies die tot nu toe uitgevoerd zijn, maakten gebruik van medicijnen die alleen de IGF1R remmen. In het laatste gedeelte van de beschouwing wordt beschreven hoe biomarkers geïdentificeerd kunnen worden, en hoe toekomstige klinische studies met IGF1R remmers verder geoptimaliseerd kunnen worden. Momenteel worden de data geanalyseerd van een klinische studie naar de werking van OSI-906 in patiënten met het Ewing-sarcoom. Biomarkers die geïdentificeerd worden in deze studie, die gecoördineerd wordt door prof. dr. A.B. Hassan van de Universiteit van Oxford, dienen getest te worden in patiënten met een osteosarcoom. De studie in patiënten met een Ewing-sarcoom is door zijn sterke translationele onderzoeksprogramma een voorbeeld voor toekomstige klinische studies in patiënten met een osteosarcoom.

Doelgerichte therapieën voor de behandeling van chondrosarcomen

In **hoofdstuk 5** wordt onderzocht of het remmen van de IGF signaaltransductieroute net als voor osteosarcomen ook een mogelijke doelgerichte therapie is voor de behandeling van chondrosarcomen. Eiwitten die deel uitmaken van de IGF signaaltransductieroute kwamen heterogeen tot expressie in chondrosarcoom cellijnen. Gefosforyleerd IRS1 werd gevonden in twee van de drie geteste cellijnen, wat een indicatie is voor activatie van de IGF signaaltransductieroute. Echter had het behandelen van chondrosarcoom cellijnen met drie verschillende remmers van deze signaaltransductieroute geen effect op chondrosarcoom proliferatie, migratie en chemoresistentie. Om uit te zoeken waarom, het remmen van deze signaaltransductie route geen effect had, ondanks dat de IGF signaaltransductie route wel actief is in een gedeelte van de cellijnen, werd expressie van de IGF1R in chondrosarcoom cellijnen en primaire tumoren bestudeerd. Door middel van immunohistochemie werd aangetoond dat alle cellijnen expressie hebben van de IGF1R, terwijl er geen (66%) of matige (34%) expressie van de IGF1R gevonden werd in primaire tumoren. Het vergelijken van de expressieniveaus van de IGF1R tussen cellijnen en primair tumor materiaal afkomstig uit dezelfde patiënt, suggereerde dat de expressie van de IGF1R tijdens de kweek *in vitro* verhoogd wordt. Dit trekt de representativiteit van chondrosarcoom cellijnen om de IGF signaaltransductie te bestuderen in twijfel. Concluderend laat hoofdstuk 5 zien dat inhibitie van de IGF signaaltransductieroute geen geschikte therapie is voor de behandeling van het chondrosarcoom.

Om andere doelgerichte therapieën voor de behandeling van chondrosarcomen te identificeren werd in hoofdstuk 6 en 7 een andere benadering gekozen, waarbij de genetische eigenschappen van deze tumor benut werden. Ongeveer de helft van de conventionele chondrosarcomen heeft een mutatie in het *isocitraatdehydrogenase-1 (IDH1)* of *IDH2* gen. Deze mutaties leiden mogelijk tot specifieke veranderingen in het celmetabolisme, welke als aangrijpingspunt voor therapie zouden kunnen dienen. **Hoofdstuk 6** beschrijft een studie naar nicotinamideadeninedinucleotide (NAD⁺)-depletie, wat reeds geïdentificeerd was als een mogelijk doelgerichte therapie voor de behandeling van *IDH1/2*

gemuteerde gliomen. Nicotinamidesfosforibosyltransferase (NAMPT) en nicotinezuurfosforibosyltransferase (NAPRT) zijn de limiterende enzymen in the synthese van NAD⁺. De behandeling van elf chondrosarcoom cellijnen met twee NAMPT-remmers resulteerde in een dosisafhankelijke afname van de proliferatie, invasie en kolonievorming. Bij bijna de helft van de cellijnen was de concentratie NAMPT-remmer die nodig is om proliferatie te halveren onder de 10 nanomolair. qRT-PCR-experimenten toonden aan dat er een negatieve correlatie is tussen NAPRT expressie en de gevoeligheid van de cellen voor NAMPT-remmers. Daarnaast correleerde lagere methylatie van de NAPRT-promotor met hogere NAPRT-expressie. Tevens werd er hogere methylatie van de NAPRT-promotor in hooggradige ten opzichte van laaggradige kraakbeentumoren gevonden. In tegenstelling tot onze initiële hypothese gaf de *IDH1/2*-mutatiestatus geen verschil in gevoeligheid voor NAMPT-inhibitie. Tevens was er geen verschil in NAPRT-methylatie tussen *IDH1/2* gemuteerde en ongemuteerde tumoren. Samenvattend toont hoofdstuk 6 aan dat medicijnen die NAMPT remmen een doelgerichte therapie voor de behandeling van het chondrosarcoom zouden kunnen zijn, in het bijzonder voor hooggradige tumoren, onafhankelijk van de *IDH1/2*-mutatiestatus.

Omdat meerdere studies hebben aangetoond dat *IDH1/2* gemuteerde gliomen afhankelijk zijn van glutaminolyse, beschrijft **hoofdstuk 7** een preklinische onderzoek naar het remmen van glutaminolyse als doelgerichte therapie voor de behandeling van het chondrosarcoom. Door middel van immunohistochemie werd aangetoond dat hogere glutaminase-expressie correleerde met een hogere tumorgraad, en qRT-PCR-analyses van chondrosarcoom cellijnen wezen uit dat glutaminase hoger tot expressie komt in chondrosarcoom cellijnen dan in normaal controleweefsel (groeischijfen kraakbeen). Het behandelen van chondrosarcoom cellijnen met de glutaminaseremmer CB-839 toonde aan dat een gedeelte van de chondrosarcoom cellijnen inderdaad gevoelig is voor glutaminolyse inhibitie. Omdat de veiligheid van CB-839 voor mensen nog onderzocht wordt, werden ook de medicijnen metformine (antidiabetesmedicijn), fenformine (lipofiele analoog van metformine) en chloroquine (antimalariamedicijn) *in vitro* onderzocht omdat deze medicijnen net als CB-839 de glutaminolyse remmen. Deze vier medicijnen remden de groei van een gedeelte van de chondrosarcoom cellijnen. Om de cellulaire mechanismen van deze inhibitie te bestuderen,

werden apoptose, autofagie en mTOR-activiteit bestudeerd. De medicijnen die in deze studie gebruikt zijn leken geen apoptose te induceren, maar metformine en fenformine verminderde wel de activiteit van mTOR. Daarnaast verlaagde metformine autofagie, iets dat juist geïnduceerd werd door chloroquine. Hoe CB-839 de groei van chondrosarcomen remt moet in de toekomst verder onderzocht worden. Net als in hoofdstuk 6 konden we onze initiële hypothese dat *IDH1/2* gemuteerde chondrosarcomen meer afhankelijk zouden van glutaminolyse niet bevestigen, aangezien er geen correlatie was tussen de *IDH1/2*-mutatiestatus en de gevoeligheid voor glutaminolyse-remmende medicijnen of de expressie levels van glutaminase in primaire tumoren. Concluderend toont hoofdstuk 7 aan dat het remmen van de glutaminolyse een doelgerichte therapie voor de behandeling van chondrosarcomen zou kunnen zijn, onafhankelijk van de *IDH1/2*-mutatiestatus.

Samenvatting

In dit proefschrift zijn studies beschreven die nieuwe aangrijpingspunten voor therapieën verkennen doordat zij cellulaire signaaltransductieroutes identificeren die essentieel zijn voor de overleving van osteosarcoom- en chondrosarcoom cellen. Ondanks dat klinische studies met IGF signaaltransductieremmers tegenvallende resultaten geven, ondersteunt dit proefschrift de visie dat deze remmers wel degelijk gebruikt zouden kunnen worden als doelgerichte therapie voor behandeling van het osteosarcoom, mits de juiste patiënten geselecteerd worden en er gebruik wordt gemaakt van medicijnen die simultaan de IGF1R en de IR remmen. Als geoptimaliseerde klinische studies in de toekomst uitgevoerd worden, dienen er geen patiënten met een chondrosarcoom geïnccludeerd te worden omdat hier geen preklinische rationale voor is. Wij hebben twee signaaltransductieroutes geïdentificeerd in chondrosarcomen die wel een mogelijk aangrijpingspunt zijn voor doelgerichte therapieën, namelijk NAD^+ -synthese en glutaminolyse. Chondrosarcoom patiënten dienen geïnccludeerd te worden in klinische studies met remmers van deze signaaltransductieroutes, ongeacht de aan- of afwezigheid van een *IDH1/2* mutatie.

Curriculum Vitae

Elisabeth Francisca Patricia Peterse was born on the 29th of January 1991 in Diessen, the Netherlands. She attended pre-university education at the Odulphuslyceum in Tilburg. After graduating in 2009, she started the Bachelor's program Biomedical Sciences at Leiden University. During her Bachelor's, Elisabeth participated in the Honours College Bèta and Life Science, and studied at the Karolinska Institutet in Stockholm, Sweden, as part of an Erasmus exchange program. In addition, she enrolled in the MSc/PhD-track and started extracurricular research under supervision of dr. A.M. Cleton-Jansen at the Department of Pathology, Leiden University Medical Center (LUMC). After receiving her Bachelor's degree in 2012, Elisabeth continued her studies by attending the Research Master program Biomedical Sciences at Leiden University. Her first Master's internship was at the Ludwig Institute for Cancer Research, University of Oxford, United Kingdom under the supervision of dr. G.L. Bond, where she analysed genetic variants that affect human cancer risk. Upon her return, Elisabeth enrolled in the Leiden Leadership Program from the Leiden University Honours Academy and continued her MSc/PhD research under the supervision of dr. A.M. Cleton-Jansen and prof. dr. J.V.M.G. Bovée as part of her second Master's internship. After receiving her Master of Science degree with distinction in 2014, she received funding from the MSc/PhD-track to continue her PhD. The results obtained during this PhD are described in this thesis. In June 2016, Elisabeth started her second PhD in the group of dr. I. Lansdorp-Vogelaar and prof. dr. H.J. de Koning at the Department of Public Health, Erasmus Medical Center, Rotterdam.

List of publications

- Peterse EFP, Niessen B, Addie RD, de Jong Y, Cleven AHG, Kruisselbrink AB, van den Akker BEWM, Molenaar RJ, Cleton-Jansen AM, Bovée JVMG (2018) Targeting glutaminolysis in chondrosarcoma in context of the IDH1/2 mutation. *British Journal of Cancer* **In Press**
- Peterse EFP, van den Akker BEWM, Niessen B, Oosting J, Suijker J, de Jong Y, Danen EHJ, Cleton-Jansen AM, Bovée JVMG (2017) NAD Synthesis Pathway Interference Is a Viable Therapeutic Strategy for Chondrosarcoma. *Molecular Cancer Research* **15**(12): 1714-1721
- Peterse EFP, van Leeuwen TN, Cleton-Jansen AM (2017) A researcher's perspective on the quantity of osteosarcoma *in vitro* studies. *Journal of Bone Oncology* **7**: 29-31
- Peterse EFP, Cleven AHG, de Jong Y, Briaire-de Bruijn IH, Fletcher JA, Danen EHJ, Cleton-Jansen AM, Bovée JVMG (2016) No preclinical rationale for IGF1R directed therapy in chondrosarcoma of bone. *BMC Cancer* **16**: 475
- Peterse EFP, Bovée JVMG (2016) *CORR* Insights®: Transcriptional Profiling Identifies the Signaling Axes of IGF and Transforming Growth Factor-beta as Involved in the Pathogenesis of Osteosarcoma. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **474**(1): 190-2
- Kuijjer ML, Peterse EFP, van den Akker BEWM, Briaire-de Bruijn IH, Serra M, Meza-Zepeda LA, Myklebost O, Hassan AB, Hogendoorn PCW, Cleton-Jansen AM (2013) IR/IGF1R signaling as potential target for treatment of high-grade osteosarcoma. *BMC Cancer* **13**: 245
- van Maldegem AM, Bovée JVMG, Peterse EFP, Hogendoorn PCW, Gelderblom H (2016) Ewing sarcoma: The clinical relevance of the insulin-like growth factor 1 and the poly-ADP-ribose-polymerase pathway. *European Journal of Cancer* **53**: 171-80
- Baranski Z, de Jong Y, Ilkova T, Peterse EFP, Cleton-Jansen AM, van de Water B, Hogendoorn PCW, Bovée JVMG, Danen EHJ (2015) Pharmacological inhibition of Bcl-xL sensitizes osteosarcoma to doxorubicin. *Oncotarget* **6**(34): 36113-25

- Zeron-Medina J, Wang X, Repapi E, Campbell MR, Su D, Castro-Giner F, Davies B, Peterse EFP, Sacilotto N, Walker GJ, Terzian T, Tomlinson IP, Box NF, Meinshausen N, De Val S, Bell DA, Bond GL (2013) A polymorphic p53 response element in KIT ligand influences cancer risk and has undergone natural selection. *Cell* **155**(2): 410-22

Acknowledgements

I am using this opportunity to express my gratitude to everyone who made this thesis possible. I owe sincere gratitude to my promoter, prof. dr. J.V.M.G. Bovée, and my copromotor, dr. A.M. Cleton-Jansen. Judith, your ambition has been inspiring. I especially thank you for your outstanding contribution to the development of my writing skills, which will be useful for my entire career. Anne-Marie, you provided me with many opportunities; my educational program would not have been the same without you. I greatly admire your everlasting enthusiasm, motivation and dedication. In addition, all colleagues from the bone and soft tissue group are acknowledged, in particular the technicians Brendy, Inge, Pauline and Alwine who provided me with essential support. Bertine, I enjoyed working with you and wish you all the best with your career. I also thank all my previous roommates for all the times we played “Klaverjassen” and for the times we had fun. Finally, I would like to thank my family and friends for their believe in me. Bram, thank you for your endless support.