



Universiteit
Leiden
The Netherlands

A screening based approach to find new paths for targeted treatment in chondrosarcoma

Jong, Y. de

Citation

Jong, Y. de. (2020, September 2). *A screening based approach to find new paths for targeted treatment in chondrosarcoma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136273>

Version: 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/1887/136273>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136273> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Jong, Y. de

Title: A screening based approach to find new paths for targeted treatment in chondrosarcoma

Issue Date: 2020-09-02

Nederlandse Samenvatting

Chondrosarcomen zijn kwaadaardige kraakbeenvormende tumoren, die zich voornamelijk ontwikkelen in de botten van het bekken, de ribben en de ledematen. Deze tumoren worden voornamelijk gevonden rond het vijftigste levensjaar. Chondrosarcomen zijn verantwoordelijk voor 20% van al de kwaadaardige bontumoren [1] en kunnen onderverdeeld worden in : conventioneel chondrosarcoom (85%), gedifferentieerd chondrosarcoom (10%) [2], mesenchymaal chondrosarcoom (2%) [3], helder cellig chondrosarcoom (2%) [4] en periostaal chondrosarcoom (1%) [1]. Het conventionele chondrosarcoom is verder onderverdeeld in centraal (85%) en perifeer (15%), op basis van de locatie centraal in het merg (de medulla) of aan het oppervlak van het bot. De histologische kenmerken van centrale en perifere chondrosarcomen zijn hetzelfde, maar ze vertonen een andere genetische achtergrond; centrale chondrosarcomen hebben een mutatie in *IDH1* of *IDH2* in circa vijftig procent van de gevallen, terwijl mutaties in *EXT1* of *EXT2* belangrijk zijn bij het ontstaan van perifere chondrosarcomen. Conventionele chondrosarcomen kunnen op basis van de histologische kenmerken worden onderverdeeld in drie verschillende graden (graad I-III). Graad III chondrosarcomen zijn het meest kwaadaardig en patiënten met deze tumor hebben een 10 jaars overleving van 26-29% [1, 5-7]. Gedifferentieerd chondrosarcoom is een hooggradige tumor die in circa vijftig procent van de gevallen een *IDH1*- of *IDH2*-mutatie laat zien [8]. Patiënten met gedifferentieerd chondrosarcoom hebben een 10-jaars overlevingskans van slechts 10-28%, afhankelijk van de aanwezigheid van metastasen [9]. Mesenchymale chondrosarcomen worden genetisch gekenmerkt door een *HEY1-NCOA2* fusie en overlevingspercentages over 10 jaar worden gerapporteerd tussen 27 en 67% [10, 11]. Het heldercellig chondrosarcoom is een laaggradige tumor met een sterftcijfer van 15% [12]. Er zijn geen specifieke genetische veranderingen geïdentificeerd in dit subtype. Periostale chondrosarcomen zijn zeer zeldzaam en er zijn weinig onderzoeken gerapporteerd waarin dit subtype werd onderzocht. *IDH1* of *IDH2* mutaties zijn geïdentificeerd in 15% van de gevallen [13].

In dit proefschrift worden experimenten beschreven waarbij siRNA en compound screens zijn gebruikt om nieuwe therapeutische opties te vinden voor het behandelen van chondrosarcomen. Verder wordt de rol van apoptose eiwitten van de Bcl-2 familie beschreven en een studie waarbij gekeken is naar radioresistentie mechanismen in chondrosarcoom cellijnen en patiënt weefsel. In **Hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van genetische en andere belangrijke veranderingen die zijn gevonden in de verschillende subtypen van het chondrosarcoom. Dit illustreert de

complexiteit en heterogeniteit van de verschillende chondrosarcoom subtypen. **Hoofdstuk 3** beschrijft de karakterisatie van een nieuwe mesenchymale chondrosarcoom cellijn MCS170; de eerste cellijn beschreven van dit zeldzame chondrosarcoom subtype. We bevestigden de aanwezigheid van de karakteristieke HEY1-NCAO2 fusie en detecteerden een hoge expressie van apoptose eiwitten Bcl-2 en vooral Bcl-xl. Remmen van deze Bcl-2 familie eiwitten met ABT-737 zorgde er voor dat de cellen veel gevoeliger werden voor chemotherapie, zoals ook al eerder werd aangetoond voor het conventionele en gedifferentieerd chondrosarcoom [14, 15]. **Hoofdstuk 4** gaat dieper in op de rol van Bcl-2-familie eiwitten in het chondrosarcoom en resistentie tegen conventionele chemotherapie. We onderzochten de remming van Bcl-2 en Bcl-xl specifiek in chondrosarcoom cellijnen en in een rat chondrosarcoom model. Uit deze experimenten konden we concluderen dat niet Bcl-2, maar Bcl-xl het belangrijkste is voor de overleving van chondrosarcoom cellen zowel *in vitro* als *in vivo*. Een subset van cellijnen vertoonde een synergistische respons wanneer Bcl-xl werd geremd in combinatie met chemotherapie, wat aangeeft dat de betrokkenheid van Bcl-xl bij chemotherapieresistentie heterogeen is in dit panel van chondrosarcoom cellijnen. Dit toont aan dat verder onderzoek, en mogelijk ook een gepersonaliseerde benadering, nodig is om te beoordelen of de combinatie van Bcl-xl remmers en chemotherapie toepasbaar is bij patiënten met een chondrosarcoom. **Hoofdstuk 5** beschrijft de identificatie van survivin als een essentiële regulator in chondrosarcoom cellen. Een siRNA-screen gericht op 51 apoptose gerelateerde genen identificeerde BIRC5, coderend voor het survivin eiwit, als essentieel voor de overleving van chondrosarcoom cellijnen. Survivin heeft meerdere functies, afhankelijk van de locatie in de cel [16]. Survivin in de kern speelt een rol in de celcyclus, terwijl cytoplasmatisch survivin betrokken is bij apoptose. In onze studie tonen we aan dat expressie van survivin in zowel de kern als het cytoplasma gecorreleerd waren met een hogere histologische graad en dus met toegenomen agressiviteit van de tumor. Bovendien was survivin expressie in de kern gecorreleerd met P53 expressie. Vooral *TP53* gemuteerde chondrosarcoom cellijnen waren gevoelig voor het remmen van Survivin. Dit resulteerde niet in apoptose, maar wel verstoring van de celcyclus. Dit toont aan dat het remmen van Survivin een mogelijke therapeutische optie kan zijn voor patiënten met *TP53* gemuteerd chondrosarcoom. In **Hoofdstuk 6** wordt de ontdekking van celcyclus eiwitten als mogelijke therapeutische optie voor patiënten met een chondrosarcoom beschreven. Door het uitvoeren van een specifiek op kinases gerichte siRNA (n = 779) en drug screen (n = 273) werden PLK1, CHK1 en AURKA ontdekt als cruciale eiwitten

voor de overleving van chondrosarcoom cellen. Kinaseremmers die zich richten op deze drie eiwitten werden gevalideerd in een panel van chondrosarcoom cellijnen waarbij de vitaliteit van de cellen afnam bij toename van de dosis. Tevens werd een verhoogde gevoeligheid voor conventionele chemotherapie na CHK1 remming gezien. Expressie van AURKA en CHK1, maar niet van PLK1, werd waargenomen in chondrosarcoom tumor weefsel, wat vraagtekens zet bij het belang van het remmen van PLK1 als behandelingsmethode voor chondrosarcoom patiënten. CHK1 expressie was gecorreleerd met een slechtere algehele overleving. Hoewel verder onderzoek nodig is om deze bevindingen te valideren, lijkt CHK1 de meest veelbelovende kinase om te remmen in patiënten met een niet operabel of gemetastaseerd chondrosarcoom. **Hoofdstuk 7** richt zich op het chondrosarcoom metabolisme en hoe deze eventueel te gebruiken als therapeutische optie. Een drug screen met 39 metabole drugs, gericht tegen verschillende metabole cellulaire systemen werd uitgevoerd in chondrosarcoom cellijnen. Na een aantal selectieronden werd mTORC1 en mTORC2 remmer sapanisertib geïdentificeerd als meest veelbelovende hit. Behandeling met sapanisertib zorgde voor een vermindering van zowel het glycolytische als oxidatieve metabolisme en een afname van de vitaliteit in chondrosarcoom cellen, bij een toenemende dosis. Bovendien werd de groei van de tumor vertraagd in een chondrosarcoom muismodel, wat aangeeft dat het remmen van mTOR als enkele of gecombineerde behandeling een mogelijke optie voor chondrosarcoom behandeling zou kunnen zijn. **Hoofdstuk 8** toont een mogelijke rol voor de RB1 signaaltransductie route in de ongevoeligheid voor radiotherapie die wordt gezien bij chondrosarcomen. Chondrosarcoom cellijnen vertonen een wisselende gevoeligheid voor γ -straling. In tegenstelling tot eerdere resultaten [17], vertoonden chondrosarcoom cellijnen behandeld met IDH1-remmer AGI-5198 geen verlaagde gevoeligheid voor γ -straling en ook geen verschil in glutathion levels. Chondrosarcoom tumorweefsels van patiënten, *ex vivo* behandeld met γ -straling, vertoonden een variabele respons, zoals gemeten met γ -H2Ax foci kwantificatie. Onze resultaten lieten zien dat tumoren die minder foci ontwikkelden na bestraling, en dus als meer radioresistent werden beschouwd, genetische veranderingen in de RB1 signaaltransductieroute vertoonden. Tumoren die meer foci ontwikkelden na bestraling lieten deze veranderingen niet zien. Of selectie voor radiotherapie kan worden gebaseerd op een intacte RB1 signaaltransductie route moet nader worden onderzocht.

Concluderend beschrijft dit proefschrift de identificatie van verschillende eiwitten die belangrijk zijn voor de overleving en chemo- en radioresistentie

van chondrosarcoom cellen. Toekomstig onderzoek naar deze eiwitten moet uitwijzen of deze geschikt zijn als therapeutische aangrijpingspunten. Nieuwe opkomende technieken, zoals CRISPR-screening en 3D-modellen die meer op de patiënten situatie lijken, zullen de selectie van relevante targets verbeteren en leiden tot een betere vertaling van preklinisch onderzoek naar de klinische praktijk.

References

1. Bovee JVMG, Bloem JL, Flanagan AM, Nielsen GP, Yoshida A : Central atypical cartilaginous tumour/chondrosarcoma grade I, Secondary peripheral atypical cartilaginous tumour/ chondrosarcoma grade I, Central chondrosarcoma grades II and III, Secondary peripheral chondrosarcoma grades II and III. In WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. Edited by Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F2020: 370-379
2. Inwards C, Hogendoorn PCW: Dedifferentiated chondrosarcoma. In WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. Edited by Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F2020: 388-390
3. Nakashima Y, de Pinieux G, Ladanyi M: Mesenchymal chondrosarcoma. In WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. Edited by Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F2020: 385-387
4. E.F.McCarthy, Hogendoorn PCW: Clear Cell Chondrosarcoma. In WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 2020: 383-384
5. Evans HL, Ayala AG, Romsdahl MM: Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer* 1977, 40:818-831.
6. Gelderblom H, Hogendoorn PCW, Dijkstra SD, van Rijswijk CS, Krol AD, Taminiau AH, Bovee JV: The clinical approach towards chondrosarcoma. *Oncologist* 2008, 13:320-329.
7. van Praag Veroniek VM, Rueten-Budde AJ, Ho V, Dijkstra PDS, Study group B, Soft tissue t, Fiocco M, van de Sande MAJ: Incidence, outcomes and prognostic factors during 25 years of treatment of chondrosarcomas. *Surg Oncol* 2018, 27:402-408.
8. Amary MF, Bacsi K, Maggiani F, Damato S, Halai D, Berisha F, Pollock R, O'Donnell P, Grigoriadis A, Diss T, et al: IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *JPathol* 2011, 224:334-343.
9. Grimer RJ, Gosheger G, Taminiau A, Biau D, Matejovsky Z, Kollender Y, San-Julian M, Gherlinzoni F, Ferrari C: Dedifferentiated chondrosarcoma: prognostic factors and outcome from a European group. *Eur J Cancer* 2007, 43:2060-2065.
10. Dantonello TM, Int-Veen C, Leuschner I, Schuck A, Furtwaengler R, Claviez A, Schneider DT, Klingebiel T, Bielack SS, Koscielniak E: Mesenchymal chondrosarcoma of soft tissues and bone in children, adolescents, and young adults: experiences of the CWS and COSS study groups. *Cancer* 2008, 112:2424-2431.
11. Frezza AM, Cesari M, Baumhoer D, Biau D, Bielack S, Campanacci DA, Casanova J, Esler C, Ferrari S, Funovics PT, et al: Mesenchymal chondrosarcoma: prognostic factors and outcome in 113 patients. A European Musculoskeletal Oncology Society study. *EurJCancer* 2015, 51:374-381.
12. McCarthy EF, Hogendoorn PCW: Clear Cell Chondrosarcoma. In WHO classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. F2020: 383-384
13. Cleven AH, Zwartkruis E, Hogendoorn PC, Kroon HM, Briaire-de BI, Bovee JV: Periosteal chondrosarcoma: a histopathological and molecular analysis of a rare chondrosarcoma subtype. *Histopathology* 2015, 67:483-490.

14. Terek RM, Schwartz GK, Devaney K, Glantz L, Mak S, Healey JH, Albino AP: Chemotherapy and P-glycoprotein expression in chondrosarcoma. *JOrthopRes* 1998, 16:585-590.
15. van Oosterwijk JG, Herpers B, Meijer D, Briaire-de Bruijn IH, Cleton-Jansen AM, Gelderblom H, van de Water B, Bovee JVMG: Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance. *AnnOncol* 2012, 23:1617-1626.
16. van Oosterwijk JG, Meijer D, van Ruler MA, van den Akker BE, Oosting J, Krenacs T, Picci P, Flanagan AM, Liegl-Atzwanger B, Leithner A, et al: Screening for potential targets for therapy in mesenchymal, clear cell, and dedifferentiated chondrosarcoma reveals Bcl-2 family members and TGFbeta as potential targets. *AmJPathol* 2013, 182:1347-1356.
17. Wyman JJ, Hornstein AM, Meitner PA, Mak S, Verdier P, Block JA, Pan J, Terek RM: Multidrug resistance-1 and p-glycoprotein in human chondrosarcoma cell lines: expression correlates with decreased intracellular doxorubicin and in vitro chemoresistance. *JOrthopRes* 1999, 17:935-940.
18. Altieri DC: Survivin - The inconvenient IAP. *SeminCell DevBiol* 2015, 39:91-96.
19. Molenaar RJ, Botman D, Smits MA, Hira VV, van Lith SA, Stap J, Henneman P, Khurshed M, Lenting K, Mul AN, et al: Radioprotection of IDH1-Mutated Cancer Cells by the IDH1-Mutant Inhibitor AGI-5198. *Cancer Res* 2015, 75:4790-4802.

