



Universiteit
Leiden
The Netherlands

In vitro models of bone-forming tumours: from target to treatment

Franceschini, N.

Citation

Franceschini, N. (2022, November 9). *In vitro models of bone-forming tumours: from target to treatment*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3485770>

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/1887/3485770>

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

Chapter 9

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

List of publications

Nawoord

Nederlandse samenvatting

Botvormende tumoren zijn zeldzame tumoren die gekenmerkt worden door botafzetting. Hieronder vallen osteoïd osteoom, osteoblastoom en osteosarcoom. De moleculaire pathologie verschilt sterk tussen deze tumoren. Osteoïd osteoom en osteoblastoom zijn tumoren met een simpel genetisch profiel en vertonen vaak translocaties van het FOS-gen, terwijl osteosarcoom een tumor is met een complex genetisch profiel en niet wordt gekenmerkt door een specifieke mutatie of translocatie. De rol van FOS in de pathogenese van osteoïd osteoom en osteoblastoom is niet volledig bekend. Voor osteosarcoom belemmert het complexe genetische profiel de identificatie van driver genen.

Dit proefschrift beschrijft onderzoek met als doel de pathogenese van botvormende tumoren te bestuderen en om nieuwe behandelingsopties voor osteosarcoom te ontdekken. Goede modellen zijn essentieel om de pathogenese te bestuderen en daarom beschrijft het eerste deel van dit proefschrift de ontwikkeling van *in vitro* modellen voor de functionele analyse van moleculaire veranderingen in botvormende tumoren. In het tweede deel van dit proefschrift worden *in vitro* modellen gebruikt om nieuwe therapieën voor osteosarcoom te testen.

Deel 1: *in vitro* modellen voor de functionele analyse van moleculaire veranderingen in botvormende tumoren

In **hoofdstuk 3** is er een *in vitro* model ontwikkeld voor osteoïd osteoom en osteoblastoom. Deze tumoren hebben vaak translocaties in het FOS-gen, dat leidt tot een verkorte versie van het FOS eiwit. Voor het *in vitro* model voor osteoïd osteoom en osteoblastoom zijn foetale mesenchymale stamcellen getransduceerd en deze cellen brengen de verkorte versie van het FOS eiwit tot over-expressie. Dit hoofdstuk heeft aangetoond dat mesenchymale stamcellen die de verkorte versie van FOS tot expressie brengen een licht verminderd osteogeen differentiatievermogen hebben, en een verminderde proliferatiesnelheid. Hiermee vertonen deze cellen gelijkenissen met osteoïd osteoom en osteoblastoom.

In **hoofdstuk 4** is er een *in vitro* model ontwikkeld voor osteosarcoom. Hiervoor zijn mesenchymale stamcellen van muizen en honden gebruikt. Eerdere studies hebben aangetoond dat mesenchymale stamcellen van muizen spontane transformatie ondergaan na langdurige kweek, maar in dit hoofdstuk is er voor het eerst vastgesteld dat ook mesenchymale stamcellen van honden spontane transformatie kunnen ondergaan. Getransformeerde mesenchymale stamcellen van muizen en honden vertonen een groot aantal structurele genetische afwijkingen, waaronder aneuploidie en translocaties, en zijn daarom qua moleculaire genetica zeer goed vergelijkbaar met humaan osteosarcoom. Daarnaast heeft dit proefschrift ook aangetoond dat spontaan getransformeerde mesenchymale stamcellen van muizen en honden vaak de genen *TP53* of *CDKN2A/CDKN2B* verliezen. Deze genen zijn in humaan osteosarcoom ook het meest frequent aangedaan. Deze

resultaten laten zien dat dit *in vitro* model gebruikt kan worden als model voor osteosarcoom en andere sarcomen met een complex genetisch profiel.

Deel 2: Gebruik van *in vitro* modellen om nieuwe behandelingsmogelijkheden voor osteosarcoom te identificeren

In de laatste decennia is de behandelingsstrategie voor osteosarcoom nauwelijks verbeterd en dit onderstreept het belang van het ontdekken van nieuwe therapieën. In deel 2 van dit proefschrift werden 2D en 3D celkweekmodellen gebruikt voor het preklinisch testen van nieuwe therapieën voor osteosarcoom.

In **hoofdstuk 5** werden mesenchymale stamcellen van muizen gebruikt om aan te tonen dat verlies van de genen *CDKN2A* en *CDKN2B* vroege gebeurtenissen zijn in de transformatie naar osteosarcoom. Het verlies van *CDKN2A* en *CDKN2B* impliceert dat cellen gevoelig zijn voor behandeling met CDK4/CDK6 remmer palbociclib, en osteosarcoom cellijnen met een verlies van p16 waren inderdaad gevoeliger voor palbociclib vergeleken met wild-type cellen. Dit is ook aangetoond in hoofdstuk 7, waarin een 3D kweek van een osteosarcoom – met verlies van *CDKN2A* - gevoelig was voor palbociclib. Deze resultaten suggereren dat palbociclib mogelijk een nieuwe therapeutische optie voor osteosarcoompatiënten is. Andere preklinische studies hebben aangetoond dat CDK4/CDK6 remmers veelbelovend zijn als nieuwe behandelingsoptie. De klinische trials waarin CDK4/CDK6 remmers worden getest in osteosarcoompatiënten moeten uitwijzen of deze remmers ook *in vivo* veelbelovend zijn.

Hoofdstuk 6 beschrijft een andere potentiële therapie voor osteosarcoompatiënten. Hierin werd aangetoond dat osteosarcoom cellen gevoelig zijn voor de NAMPT remmer FK866. Osteosarcoom cellen met lage NAMPT RNA expressie, of hoge NAMPT promotor methylering, waren het meest gevoelig voor FK866. Hoewel het exacte mechanisme van de NAMPT remmer FK866 nog verder moet worden opgehelderd, suggereren deze resultaten dat FK866 mogelijk een nieuwe behandelingsoptie voor osteosarcoompatiënten is.

Hoofdstuk 5 en hoofdstuk 6 laten zien dat er helaas geen 'one size fits all' behandeling is voor osteosarcoompatiënten, aangezien slechts een subgroep van osteosarcoom patiënten baat heeft bij een behandeling zoals FK866. In hoofdstuk 7 is er dan ook *whole exome sequencing* uitgevoerd op osteosarcomen om specifieke genetische veranderingen per patiënt in kaart te brengen. De tumoren zijn in 3D gekweekt om vervolgens per patiënt een specifieke behandeling uit te testen. Echter werd de respons op een behandeling niet voorspeld door de genetische verandering en dit geeft aan dat er meer onderzoek nodig is naar nieuwe specifieke behandelingsstrategieën voor osteosarcoompatiënten.

2D kweken vs 3D kweken

In de hoofdstukken 5, 6 en 7 zijn verschillende *in vitro* modellen voor het preklinisch testen van geneesmiddelen gebruikt: van 2D cellijnen tot 3D gekweekte tumorcellen. In hoofdstuk 7

zijn deze verschillende 3D kweekmethoden vergeleken met conventionele 2D kweekmethoden.

Er is aangetoond dat de gevoeligheid van de kweken sterk verschilt, waarbij 3D kweken minder gevoelig zijn vergeleken met 2D kweken. Bovendien waren 2D cellen gekweekt in een 3D omgeving ook minder gevoelig vergeleken met 3D gekweekte cellen die nooit op een plastic oppervlak hebben gegroeid. Het is dus belangrijk om zorgvuldig af te wegen welk model het meest representatief is voor de *in vivo* situatie. Dit zal uiteindelijk moeten worden aangetoond in diermodellen en in klinische studies. Over het algemeen is men het erover eens dat 3D kweken wel representatiever zijn in vergelijking met 2D kweken, met name in sarcomen vanwege de meestal uitgebreide extra cellulaire matrix die alleen door tumorcellen wordt geproduceerd als deze in 3D groeien. 2D kweken zijn echter nog steeds nuttig voor een eerste screening van potentiële nieuwe behandelingen. Dit is met name van belang voor grootschalige *high-throughput screening*. De reproduceerbaarheid, materiaalkosten en arbeidsintensiviteit zijn belangrijke factoren waarmee rekening moet worden gehouden bij 3D kweken, aangezien 3D kweken nog steeds uitdagend blijken. Vooral 3D kweken direct afkomstig uit primaire tumoren zijn erg arbeidsintensief en kostbaar. Desalniettemin kunnen 3D kweken een waardevolle aanvulling vormen voor het preklinisch testen van geneesmiddelen en zo het gebruik van dierproeven tot een minimum beperken.

Concluderende opmerkingen

Dit proefschrift beschrijft het genereren van *in vitro* modellen op basis van mesenchymale stamcellen om het onderliggende moleculaire mechanisme van de botvormende tumoren osteoïd osteoma, osteoblastoma en osteosarcoom verder op te helderen. Daarnaast wordt ook de identificatie van nieuwe behandelingsmogelijkheden voor osteosarcoom met behulp van 2D en 3D *in vitro* modellen in dit proefschrift beschreven.

Dit proefschrift heeft aangetoond dat de translocatie van FOS – veel voorkomend in osteoïd osteoom en osteoblastoom - de osteogene differentiatie en proliferatiesnelheid van mesenchymale stamcellen vermindert, en zo een mogelijke verklaring biedt voor het fenotype dat wordt waargenomen in osteoïd osteoom en osteoblastoma. Daarnaast is aangetoond dat veranderingen in de genen *TP53* en *CDKN2A/CDKN2B* al vroeg kunnen optreden tijdens het ontstaan van osteosarcoom. Deze ontdekking kan leiden tot nieuwe therapieën voor patiënten met osteosarcoom: zo kunnen patiënten met verlies van *CDKN2A/CDKN2B* behandeld worden met palbociclib.

Het onderzoek naar het moleculaire mechanisme en het preklinisch testen van nieuwe behandelingsopties in botvormende tumoren werd uitgevoerd met behulp van een verscheidenheid aan *in vitro* modellen. Niet alle modellen zijn geschikt voor elke toepassing. Cellijnen zijn ideaal voor functionele analyse van moleculaire veranderingen, terwijl gekweekt tumormateriaal meer geschikt is voor het preklinisch testen van geneesmiddelen. Ook moet zorgvuldig worden overwogen of voor 2D - dan wel voor 3D-modellen moet worden gekozen.

De gevoeligheid voor geneesmiddelen verschilt sterk tussen 2D- en 3D-kweekmodellen, waarbij 3D-modellen het minst gevoelig zijn, maar misschien wel het meest representatief voor de *in vivo* situatie. 2D-modellen zijn echter meer geschikt voor grotere drug screens gezien het gebruiksgemak. De onderzoeksvraag zal dus leidend zijn voor welk *in vitro* model gekozen kan worden.