

Mitochondria in a personalized cancer treatment approach

Citation for published version (APA):

van Gisbergen, M. W. (2017). *Mitochondria in a personalized cancer treatment approach*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20170329mvg>

Document status and date:

Published: 01/01/2017

DOI:

[10.26481/dis.20170329mvg](https://doi.org/10.26481/dis.20170329mvg)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Document license:

Unspecified

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Currently cancer is still one of the deadliest diseases. Effective treatment of solid malignancies is dependent on the tolerability of normal tissues and its effectiveness to fight the malignant cells. A cancer treatment that reduces at the same time treatment resistance and normal tissue toxicity is highly desirable. Multiple hallmarks of cancer have been described which influence tumorigenesis and treatment response. Deregulation of cellular energetics is one of these hallmarks and the topic of this thesis. Under normal physiological conditions mitochondria play an important role in the regulation of cellular metabolism and therefore they are often referred to as the “power plants of a cell”. Besides nuclear genes also 37 genes located in the mitochondria’s own DNA (mtDNA) are involved in the regulation of mitochondrial function and cellular respiration. Mitochondria and mtDNA are heterogeneous and dynamic on different levels. Mutations in mtDNA can for instance be present only in a subpopulation of the mtDNA, and as every mitochondrion can contain multiple copies of mtDNA this can lead to a different distribution of mutations in tissues. Additionally, mitochondria play a very dynamic role in various processes, as they are able to use fusion and fission to maintain functional mitochondria upon metabolic and/or environmental stress. Several associations have been found between altered mitochondrial function and tumorigenesis and even cancer treatment.

The aim of this thesis was to investigate the role of mitochondrial function, reactive oxygen species (ROS) and hypoxia modulation in tumors in view of the possibility of implementing them in a personalized treatment approach. Several molecular approaches have been used to investigate the effect of energetic stress and/or stress inducers (irradiation and hypoxia) in relation to mitochondrial function (chapter 3 and 4). In **chapter 3** we evaluated the effect of full mtDNA depletion, often used as an extreme model to investigate mitochondrial dysfunction, on radiotherapy response. Here, we found that mtDNA depleted cells derived from a variety of cell lines displayed a different response upon radiation, a phenomenon that has been previously reported by others. The antioxidant capacity of cells, in this case represented by decreased ratio of GSH:GSSG and mitochondrial super oxide dismutase (SOD2), could possibly explain a reduced response upon irradiation for different cell types and potentially influence the response towards radiotherapy in these cellular models. Hypoxia forms a well-known limitation for effective radiotherapy and corresponds with a decreased prognosis. Normally under hypoxic conditions, cells make a shift to glycolysis (the crab-tree effect) and show an increased extracellular acidification. Carbonic anhydrase (CA) IX is a hypoxia-regulated enzyme involved in maintaining the balance between a physiological intracellular pH and extracellular acidification. In **chapter 4** we investigated the effect of mitochondrial dysfunction on CAIX in 3 different manners. The induction of mitochondrial dysfunction by depleting the mitochondrial own genome, introduction of a mtDNA point mutation (normally inducing mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes” (MELAS)) and pharmacological inhibition of complex

(C) I of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) led to a decreased CAIX expression (both protein and mRNA) under hypoxic conditions. Similar results were obtained for another HIF-1 α downstream target, VEGF. In general, HIF-1 α protein levels themselves were reduced upon hypoxia after the induction of a mitochondrial dysfunction, suggesting involvement of the oxidative phosphorylation in HIF-1 α stabilization. However, the precise mechanisms still have to be further elucidated.

Furthermore, different drug strategies (dual-targeting CAIX phenformin, repurposing nitroglycerin or prodrugs such as ANS-DOX) were investigated for the ability of influencing different cancer treatment limiting parameters such as toxicity, hypoxia and drug resistance (chapter 5, 6 and 7). CAIX is upregulated in several tumors and its expression is correlated with a worse patient prognosis. Therefore, it can be exploited for targeting purposes of drugs, thereby reducing their potential side effects. In **chapter 5** we used this approach to target both CAIX and the CI of the OXPHOS by using a compound related to the biguanide metformin. Although phenformin is a more potent compound than metformin it has an unfavorable toxicity profile, but therefore it is an interesting drug to use for a dual-targeting approach. The phenformin CAIXi conjugated derivative 18 has good binding affinities to CAIX and CAXII, however, the functionality of the compound in respect to inhibiting OXPHOS was absent in our experiments. It has been described that inhibition of OXPHOS could provide a better oxygenation of the tumor as oxygen consumption is reduced. Another approach to improve the oxygen status of the tumor would be by modulating the perfusion of the tumor. Nitroglycerin, normally used to treat angina pectoris, releases nitric oxide and exhibits vasodilating properties. In **chapter 6** we observed a decreased hypoxic fraction after application of a nitroglycerin patch in tumors upfront characterized as being a ‘hypoxic tumor’ using HX4 hypoxia PET imaging. In these hypoxic tumors, the HX4 tracer uptake negatively correlated with perfusion. *In vitro*, we elucidated that the metabolism of the 2-nitroimidazole HX4 is not influenced by nitroglycerin itself and that nitroglycerin does not inhibit mitochondrial respiration, as previously has been suggested by others at doses achievable in humans. Taken together, this could suggest that the additional application of nitroglycerin for the treatment of hypoxic tumor could be beneficial, although further studies need to be performed.

Next to a dual-targeting (chapter 5) and drug repurposing (chapter 6) approach also a prodrug approach was tested. This prodrug approach is based on the principle that the prodrug is enzymatically activated under certain circumstances. In this thesis, a prodrug approach was evaluated in order to investigate the possibility of overcoming drug resistance. Unfortunately, many cancer patients suffer from resistance towards chemotherapeutics and thereby their treatment is less effective. Mechanisms involved in glutathione metabolism are often related to drug resistance, a phenomenon that is not exclusively observed in hypoxic tumors. Glutathione transferases (GST) are a class of enzymes involved in detoxification of substances and are often overexpressed in tumors

contributing to a drug resistant phenotype. GST mediated drug resistance could potentially be overcome by using a prodrugs approach. In **chapter 7**, we investigated prodrug formulations of two widely used chemotherapeutics, etoposide and doxorubicin, to overcome GST mediated resistance. For microsomal glutathione transferase (MGST1, found in the outer membrane of the mitochondria and in the membrane of the endoplasmic reticulum) overexpressing cells we observed that, 4-acetyl-2-nitro-benzenesulfonyl etoposide (ANS-etoposide) (showed a MGST1 dependent therapeutic efficacy. However, this effect was only slightly dose dependent and therapeutic efficacy was lower compared to the parental drug. This suggests that the modification reduced either the uptake of the drug or limited its activation. Overexpression of GSTA1-1, another subclass of GSTs, did show a resistant phenotype towards etoposide which could be counteracted by ANS-etoposide, suggesting that GSTA1-dependent activation of the prodrug took place. For doxorubicin, a drug known for its cardiac toxicity as a side effect, we showed that different sulfonamide moieties have an optimal GST dependent window and can be optimally activated by certain subclasses of GSTs. These prodrugs selectively target GST overexpressing cells, while limiting normal tissue side effects at the same time. However, not only GSTs interacted and were inhibited by the doxorubicin based prodrugs as thioredoxin reductase 1 (TrxR1), another important antioxidant enzyme in the thioredoxin (Trx) system, was also targeted by using these prodrugs. Influencing both the glutathione and the Trx system, these prodrugs and the concurrent effects caused by them provide us with a promising approach of targeting chemoresistant tumors.

In the different studies described within this thesis, we observed that modulation of mitochondrial function and mitochondrial proteins can contribute to alterations of treatment responses. This provides us with new insights in the involvement of mitochondrial function and mitochondrial proteins in cancer therapy. However, as tumor tissues are very heterogeneous and adaptive towards their environment, patient stratification is essential to see which subpopulations of patients would be susceptible for such treatment modulation.

Samenvatting

Kanker is tegenwoordig een van de meest dodelijke ziektes. Effectieve behandeling van solide tumoren is afhankelijk van het toelaatbare effect op het normale weefsel. De behandeling dient echter ook effectief genoeg te zijn om de kwaadaardige cellen te bestrijden. Momenteel is het noodzakelijk om de kankerbehandeling effectiever te maken, waarbij therapie resistentie van de tumoren wordt aangepakt, maar waarbij ook de normale weefsels gespaard worden. In het verleden zijn er verschillende eigenschappen van tumoren beschreven die de vorming van tumoren en het effect van kankerbehandelingen beïnvloeden. Een van deze eigenschappen is het ontregelen van het metabolisme van een cel. Onder normale fysiologische omstandigheden spelen mitochondriën vaak een belangrijke rol in het regelen van het metabolisme van een cel. Vanwege deze rol worden ze vaak beschreven als de energiefabrieken van een cel. Tot op heden zijn verschillende verbanden gevonden tussen de veranderingen in de functie van deze mitochondriën, de vorming van tumoren en kankerbehandeling. Naast de nucleaire genen zijn er ook 37 genen, aanwezig in het eigen DNA van de mitochondriën (mtDNA), betrokken bij het regelen van de mitochondriële functie en oxidatieve fosforylatie (OXPHOS). Mitochondriën en mtDNA zijn heterogeen en dynamisch van aard op verschillende niveaus. Mutaties in mtDNA kunnen bijvoorbeeld alleen aanwezig zijn in een subpopulatie van de mtDNA moleculen en aangezien elk individueel mitochondrion meerdere kopieën van het mtDNA kan bevatten, kan dit leiden tot een verschillende distributie van mutaties in weefsels. Tevens spelen mitochondriën een dynamische rol in meerdere processen, omdat ze in staat zijn om 'fusion en fission' (versmelting en deling) toe te passen om hun functionaliteit te behouden als cellen metabolische en/of andere vormen van stress ervaren. De rol van de mitochondriën en de interactie met het metabolisme gedurende de behandeling zijn een fascinerend onderzoeksveld.

Het doel van deze studie was het onderzoeken van de rol en bijdrage van de mitochondriële functie, *reactieve zuurstofverbindingen* (ROS) en hypoxie veranderingen in tumoren en hoe deze toe te passen in een persoonlijk behandelingsplan van een patiënt. Moleculair biologische experimenten werden uitgevoerd om de relatie tussen de mitochondriële functie en het effect van energetische stress en/of veroorzakers van stress (zoals hypoxie en bestraling) te onderzoeken (hoofdstuk 3 en 4). Als eerste evalueerden we het effect van volledige verwijdering van het mtDNA (depletie) op bestraling. mtDNA depletie wordt vaak gebruikt als een extreem model om de invloed van de mitochondriële dysfunctie te onderzoeken. In **hoofdstuk 3** observeerden we dat verschillende cellijnen ontdaan van hun mtDNA andere effecten hebben na bestraling, een observatie die eerder ook door anderen werd gedaan. De antioxidant capaciteit van cellen, hier weergegeven door een afname in de ratio van GSH:GSSG en mitochondriële superoxide dismutase (SOD2), kan dit mogelijk beïnvloeden en verklaren waarom een verminderd effect na bestraling plaatsvindt in bepaalde celmodellen. Voor effectieve radiotherapie is hypoxie een bekende beperkende factor die gerelateerd is aan een

verminderde prognose voor patiënten. Normaal gezien maken cellen onder hypoxische condities een verandering van hun metabolisme door en stappen ze over op glycolyse, het zo genoemde “crab-tree effect”, waarbij meer verzuring buiten de cel optreedt. Koolzuur anhydrase 9 (CAIX) is een enzym dat gereguleerd wordt door hypoxie en betrokken is bij het onderhouden van de balans tussen een fysiologische zuurtegraad binnen en verzuring buiten de cel. In **hoofdstuk 4** onderzochten we op 3 verschillende manieren het effect van mitochondriële dysfunctie op CAIX. Het veroorzaken van een mitochondriële dysfunctie door het verwijderen van het mtDNA, het introduceren van een punt mutatie in het mtDNA (hetgeen “mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, en stroke-like (=beroerteachtige) episodes” (MELAS) veroorzaakt) en farmacologische inhibitie van complex I van de OXPHOS leiden tot een verminderde CAIX-expressie (op zowel eiwit- als mRNA niveau) onder hypoxische condities. Ook een ander eiwit dat wordt beïnvloed door HIF-1 α , VEGF, vertoont een verlaagde expressie. Over het algemeen waren ook de HIF-1 α eiwitniveaus verlaagd na de inductie van de mitochondriële dysfunctie. Dit suggereert dat verlaging van HIF-1 α eiwitniveaus wellicht kunnen worden veroorzaakt door een verminderde OXPHOS-functie. Echter het exacte mechanisme moet nog verder onderzocht worden.

Tevens werden in deze thesis verschillende manieren van innovatieve medicatietoepassingen onderzocht (dual-targeting CAIX fenformine, een ander gebruik dan de huidige toepassing van nitroglycerine, en prodrugs zoals 4-acetyl-2-nitrobenzenesulfonyl doxorubicine (ANS-DOX) op effectiviteit in het beïnvloeden van verschillende parameters die een nadelige invloed hebben op kankerbehandelingen zoals toxiciteit, hypoxie en resistentie tegen de medicatie (hoofdstuk 5, 6 en 7). CAIX-expressie is verhoogd in verschillende tumoren en deze verhoogde expressie houdt verband met een slechtere prognose voor patiënten. Door deze eigenschappen is CAIX een interessant doelwit zodat bepaalde medicatie specifiek gericht tegen CAIX naar de tumor gebracht kan worden. Hierdoor kunnen mogelijke bijwerkingen van de medicatie worden verminderd. In **hoofdstuk 5** gebruikten we deze aanpak om tegelijkertijd de activiteit van CAIX en complex I van de OXPHOS te remmen. Hiervoor gebruikten we een compound die afgeleid is van metformine, namelijk fenformine. Ondanks dat fenformine een krachtigere werking heeft dan metformine, heeft het ook een minder goed toxiciteitsprofiel. Dit maakt fenformine echter een interessant molecule voor onze strategie gebaseerd op ‘dual-targeting’. Het fenformine CAIXi geconjugeerde derivaat 18 liet een goede bindingsaffiniteit zien met CAIX en CAXII, echter de functionaliteit van het molecule met betrekking tot het remmen van OXPHOS was afwezig in onze experimenten. In de literatuur is beschreven dat OXPHOS-remming kan zorgen voor een betere zuurstofstatus van de tumor, omdat het zuurstofverbruik is verminderd. Het verbeteren van de perfusie van de tumor zou mogelijk een andere manier zijn om de zuurstofstatus van de tumor te beïnvloeden. Nitroglycerine, een medicijn dat normaal wordt gebruikt voor de behandeling van angina pectoris, geeft stikstofmonoxide af en

zorgt voor vaatverwijding (vasodilatatie). Na gebruik van een nitroglycerine pleister observeerden we een afname in de hypoxische fractie enkel van de hypoxische tumoren (**hoofdstuk 6**). Hypoxie is een van de belangrijke limiterende factoren voor de behandeling van tumoren. In hypoxische tumoren is na het gebruik van een nitroglycerine pleister een omgekeerd verband tussen de opname van de hypoxie merker HX4, welke bedoeld is om de hoeveelheid hypoxie binnen een tumor te bepalen, en perfusie. Door middel van *in vitro* experimenten konden we uitsluiten dat het metabolisme van 2-nitromidazoles, waar HX4 er een van is, niet beïnvloed werd door nitroglycerine zelf. Tevens konden we uitsluiten dat de mitochondriële respiratie werd verminderd door de blootstelling van nitroglycerine aan een concentratie gevonden in het plasma van patiënten. De toevoeging van nitroglycerine aan de behandeling van hypoxische tumoren lijkt daarom veelbelovend, echter verder onderzoek is nog nodig.

Naast het gebruik van een *dual-targeting* benadering (hoofdstuk 5) en het innovatieve herbestemming van medicijnen (hoofdstuk 6) werd ook het gebruik van een activeerbaar medicijn (prodrug) getest. In deze thesis werd deze benadering gebruikt om te onderzoeken of het mogelijk was om resistentie tegen bepaalde medicatie te ondervangen. Helaas hebben vele kankerpatiënten last van resistentie tegen chemotherapie waardoor hun behandeling minder effectief is, met alle gevolgen van dien. Mechanismen welke betrokken zijn bij het glutathion metabolisme zijn vaak gerelateerd aan resistentie tegen medicatie en zijn een fenomeen dat niet exclusief aanwezig is bij hypoxische tumoren. Glutathion transferases (GSTs) zijn een klasse van enzymen betrokken bij de detoxificatie van stoffen en komen vaak tot overexpressie in tumoren. In verschillende type tumoren zijn GSTs gelinkt aan de resistentie tegen medicatie bij kankerpatiënten. Mogelijk kan door het gebruik van prodrugs de GST gemedieerde medicijnresistentie overwonnen worden. In **hoofdstuk 7** gebruikten we prodrugs gebaseerd op 2 vaak gebruikte chemotherapieën, namelijk etoposide en doxorubicine, om GST gemedieerde resistentie te overwinnen. Bij cellen die microsomale glutathion transferase 1 (MGST1, aanwezig in de buitenste membraan van het mitochondrion en in het membraan van het endoplasmatisch reticulum) tot overexpressie brengen, zagen we voor ANS-etoposide een MGST1 afhankelijke toename van de therapeutische doeltreffendheid. Echter deze toename was enkel beperkt afhankelijk van de toegevoegde concentratie en leidde tot een mindere efficiëntie vergeleken met de oorspronkelijke niet-gemodificeerde medicatie. Dit suggereert dat de modificatie leidde tot verminderde opname en/of tot verminderde activatie. Overexpressie van GSTA1-1, een andere subklasse van GSTs, liet een resistent fenotype tegenover etoposide zien die teruggebracht kon worden door het gebruik van ANS-etoposide. Dit suggereert dat GSTA1-1 afhankelijke activatie van de prodrug aanwezig was. Voor doxorubicine, een medicijn dat bekend staat voor het veroorzaken van cardiotoxiciteit bij patiënten, lieten we zien dat verschillende sulfonamide restgroepen

kunnen zorgen voor een optimaal GST afhankelijk venster. De verschillende vormen van de prodrugs kunnen optimaal geactiveerd worden door verschillende subklassen van GSTs en selectief werken op de cellen met een GST overexpressie. Hierdoor kunnen bijwerkingen op normaal weefsel verminderd worden. In deze studie observeerden we echter dat niet alleen GSTs een interactie aangingen met de prodrugs, maar dat ook een ander belangrijk antioxidant enzym (thioredoxine reductase; TrxR1) in het thioredoxine systeem werd beïnvloed door de prodrugs. Het beïnvloeden van zowel het glutathion als het Trx systeem zorgt voor een verhoogd effect en is daardoor een veelbelovende aanpak voor de behandeling van chemoresistente tumoren.

In de verschillende studies beschreven in deze thesis observeerden we dat het beïnvloeden van de mitochondriële functie en mitochondriële eiwitten kan bijdragen tot de verandering van het effect van de behandeling. Dit zorgt voor nieuwe inzichten in de betrokkenheid van mitochondriële functie en mitochondriële eiwitten in kankertherapie. Omdat echter tumorweefsels erg divers zijn en zich makkelijk kunnen aanpassen aan veranderende omstandigheden en omgeving, is de selectie van patiënten die baat hebben bij de aangepaste behandelingsmethoden echter van groot belang.