

Cell biology of retinoids in cancer : the modulating role of liarozole-fumarate

Citation for published version (APA):

van Van heusden, J. (1998). *Cell biology of retinoids in cancer : the modulating role of liarozole-fumarate*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19980219jh>

Document status and date:

Published: 01/01/1998

DOI:

[10.26481/dis.19980219jh](https://doi.org/10.26481/dis.19980219jh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

Retinoids are a group of natural and synthetic compounds that share structural and/or functional similarity to vitamin A. The most active naturally occurring retinoid is probably all-*trans*-retinoic acid (ATRA). ATRA is known to inhibit proliferation and to induce differentiation of cancer cells. Therefore, the use of ATRA in the treatment of cancer has been explored extensively. Unfortunately, its use as an anticancer drug in differentiation therapy has shown only limited clinical success. One major drawback in the use of ATRA is the prompt emergence of ATRA resistance, believed to be caused by increased ATRA metabolism. One way to tackle this problem is to develop inhibitors of ATRA metabolism that could increase endogenous levels of ATRA, thereby exerting antitumoral responses. Liarozole-fumarate has recently been identified as an inhibitor of ATRA metabolism that might prove valuable in the treatment of cancer (Chapter 1).

To find support for the hypothesis that liarozole-fumarate, besides enhancing the antiproliferative activity of ATRA, can also enhance the differentiation-inducing capacity of ATRA its effect was studied in the breast cancer cell line MCF-7 (Chapter 2). It is shown that liarozole-fumarate enhances the ATRA-induced structural remodelling of cytoskeletal proteins, cytokeratins and actin, as well as of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin. Upregulation of E-cadherin expression by ATRA is enhanced by liarozole-fumarate, suggesting that the drug can also enhance the differentiation-inducing capacities of ATRA.

The effect of liarozole-fumarate was also studied in a well-known and generally accepted model for cellular differentiation, i.e. F9 mouse teratocarcinoma cells (**Chapter 3**). In these cells, liarozole-fumarate enhances the ATRA-induced expression of well-characterized differentiation markers, such as laminin, collagen IV and cytokeratins. Concomitantly, liarozole-fumarate inhibits ATRA metabolism in these cells, linking its enhancing effects on ATRA-induced differentiation to inhibition of ATRA metabolism. Together, these data show that liarozole-fumarate enhances both the antiproliferative and the differentiation-inducing activity of ATRA by inhibiting ATRA metabolism.

In order to further finetune the mechanism of action of liarozole-fumarate, its effect was studied on the metabolites and isomers of ATRA. These studies could only be properly carried out in a steroid- and retinoid-free cell culture medium. Under these culture conditions cells are growth-arrested and can be restimulated to proliferate by the addition of well defined growth factors. Despite the stimulated cell proliferation, bromodeoxyuridine-immunosignals (a measure for cell proliferation) are barely detectable. **Chapter 4** describes an amplification method using fluorescein-labeled tyramide to specifically enhance these weak bromodeoxyuridine-immunosignals.

In **Chapter 5** it is shown that not only ATRA itself but also its catabolites, 4-oxo-ATRA and 5,6-epoxy-ATRA, as well as its stereoisomers, 9-*cis*-RA and 13-*cis*-RA, show significant antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells. However, since these catabolites and stereoisomers are formed from ATRA only to a limited extent, these results suggest that the parent compound ATRA itself is mainly responsible for its antiproliferative activity.

The antiproliferative activity of the ATRA catabolites, but not of the ATRA stereoisomers, can be enhanced by liarozole-fumarate (**Chapter 6**). Together, these results suggest that liarozole-fumarate acts as a versatile inhibitor of ATRA metabolism, in that it not only inhibits the breakdown of ATRA but also of the ATRA catabolites.

In **Chapter 7** it is discussed that catabolism of ATRA represents an inactivation pathway and that inhibition of this inactivation by liarozole-fumarate might prove valuable as a new alternative in differentiation therapy of cancer.

Samenvatting

Retinoïden zijn een groep van natuurlijke en synthetische stoffen die structureel en/of functioneel lijken op vitamine A. Het meest actieve retinoïd dat in de natuur voorkomt, is waarschijnlijk *all-trans*-vitamine A zuur (ATRA). ATRA inhibeert de proliferatie van kankercellen en induceert differentiatie in deze cellen. Daarom is het gebruik van ATRA als een antitumorale stof zeer uitgebreid onderzocht. Helaas vertoont ATRA slechts een beperkte werking als antitumorale stof in differentiatie therapie. Eén probleem bij het klinisch gebruik van ATRA, is het snelle optreden van resistentie tegen ATRA zelf. De meest aanvaarde reden voor het ontstaan van deze resistentie is een versnelde afbraak van ATRA, waardoor het zijn gunstige werking niet meer kan uitoefenen. Eén manier om dit probleem aan te pakken, is de ontwikkeling van inhibitoren om de afbraak van ATRA tegen te gaan. Zulke inhibitoren zouden endogene ATRA-spiegels kunnen verhogen en zo een antitumorale werking uitoefenen. Liarozole-fumaraat werd recent geïdentificeerd als een inhibitor van ATRA-metabolisme die beloftevol blijkt voor de behandeling van kanker (Hoofdstuk 1). Om de hypothese te testen dat liarozole-fumaraat ook de differentiatie-inducerende werking van ATRA kan versterken, werd zijn effect bestudeerd in de humane borstkanker cellijn MCF-7 (Hoofdstuk 2). Liarozole-fumaraat versterkt de structurele veranderingen die veroorzaakt worden door ATRA. Niet alleen eiwitten van het cytoskelet, zoals cytokeramines en actine, ondergaan structurele veranderingen, maar ook de cel-cel adhesiemoleculen

E-cadherine. Deze verhoging van E-cadherine expressie onder invloed van ATRA wordt versterkt door liarozole-fumaraat, hetgeen er op duidt dat liarozole-fumaraat ook de differentiatie-inducerende eigenschappen van ATRA kan versterken. Het effect van liarozole-fumaraat werd nagegaan in een goed gekarakteriseerd model voor differentiatie, namelijk F9-teratogene tumorcellen van de muis (Hoofdstuk 3). In deze cellen versterkt liarozole-fumaraat de expressie van differentiatie markers zoals laminine, collageen type IV en cytokeratines, die door ATRA geïnduceerd worden. Tegelijkertijd inhibeert liarozole-fumaraat het metabolisme van ATRA. Tezamen duiden deze gegevens erop dat liarozole-fumaraat zowel de antiproliferatieve als differentiatie-inducerende werking van ATRA versterkt door inhibitie van het ATRA-metabolisme.

Om het werkingsmechanisme van liarozole-fumaraat verder te ontrafelen, werd het effect bestudeerd op metabolieten en isomeren van ATRA. Deze studies konden enkel uitgevoerd worden in een celkweekmedium dat geen steroïden of retinoïden bevatte. Onder deze kweekcondities stoppen de cellen echter met delen, maar kunnen wel weer tot proliferatie gestimuleerd worden door groeifactoren toe te voegen. Ondanks de gestimuleerde proliferatie, blijven de bromodeoxyuridine immunosignalen (een maat voor celproliferatie) nauwelijks detecteerbaar. Hoofdstuk 4 beschrijft een methode om deze zwakke immunosignalen te versterken, waarbij gebruik gemaakt wordt van tyramide dat gelabeld is met een fluorescerende stof.

In Hoofdstuk 5 wordt aangetoond dat niet alleen ATRA zelf maar ook zijn katabolieten, 4-oxo-ATRA en 5,6-epoxy-ATRA, alsook zijn stereoisomeren, 9-*cis*-RA en 13-*cis*-RA, de proliferatie van MCF-7-cellen kunnen inhiberen. Aangezien echter deze katabolieten en stereoisomeren in beperkte mate gevormd worden vanuit ATRA, suggereren deze resultaten dat vooral ATRA zelf verantwoordelijk is voor zijn antiproliferatieve werking.

Liarozole-fumaraat kan de antiproliferatieve werking van de katabolieten versterken maar niet van de isomeren (Hoofdstuk 6). Dit wijst erop dat liarozole-fumaraat een veelzijdige inhibitor is, die niet alleen het metabolisme van ATRA inhibeert maar ook de verdere afbraak van de katabolieten van ATRA.

In Hoofdstuk 7 wordt bediscussieerd dat het katabolisme van ATRA leidt tot een inactivatie en dat inhibitie van deze inactivatie door liarozole-fumaraat waardevol kan zijn als een nieuw alternatief voor differentiatie therapie van kanker.