

University of Groningen

## The unfolded protein response in glioblastoma stem cells: towards new targets for therapy

Peñaranda Fajardo, Natalia

DOI:  
[10.33612/diss.118411504](https://doi.org/10.33612/diss.118411504)

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Peñaranda Fajardo, N. (2020). *The unfolded protein response in glioblastoma stem cells: towards new targets for therapy*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.118411504>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# Appendices

## Samenvatting

Het glioblastoom (GBM) is de meest voorkomende hersentumor bij volwassenen en heeft zeer agressieve eigenschappen die resulteren in een slechte prognose met een overlevingspercentage lager dan 10%, 2 jaar na diagnose. Chirurgische verwijdering van de tumor gevolgd door radio- en chemotherapie is momenteel de beste behandeling. De zeer invasieve tumorgroei van GBM dat volledige tumor resectie onmogelijk maakt in combinatie met een hoge mate van resistentie voor radio- en chemotherapie maakt het GBM een moeilijk te behandelen tumor. GBM-stamcellen (GSC), een specifieke kwaadaardige subpopulatie van tumorcellen in GBM, worden verantwoordelijk geacht voor deze agressieve tumoreigenschappen. Door celdeling kunnen GSC zichzelf vernieuwen maar ook gedifferentieerde cellen produceren met in het algemeen minder agressieve en therapie gevoelige eigenschappen. Onze huidige kennis van de mechanismen die GSC in stand houden en GBM tumorgroei veroorzaken is onvolledig. Er is een grote behoefte aan nieuwe en betere moleculaire doelwitten voor de ontwikkeling van effectievere therapie, die volgens de kankerstemcelhypothese met name de GSC, maar ook andere GBM cellen moeten elimineren. De verwachting is dat het therapeutisch moduleren van mechanismen verantwoordelijk voor GSC zelfvernieuwing, invasief gedrag en resistentie een bijdrage kunnen leveren aan het verbeteren van de therapie voor patiënten.

De 'unfolded protein response' (UPR) is een adaptief kwaliteitscontrolemechanisme dat eiwithomeostase in het endoplasmatische reticulum (ER) in cellen handhaaft. ER-stress veroorzaakt bijvoorbeeld door hypoxie, een tekort aan voedingsstoffen / glucose of door therapeutische middelen beïnvloedt de homeostase van eiwitten, wat resulteert in activering van de UPR. Drie ER-membraan gelokaliseerde stresssensoren, IRE1, PERK en ATF6, initiëren en coördineren de UPR met het doel herstel en overleving van cellen, of bij onvoldoende herstel celdood. In kankercellen, waaronder GBM cellen, is de UPR chronisch geactiveerd door een aanhoudende ER-stress als gevolg van een agressieve tumormicro-omgeving en een hoge vraag naar eiwitsynthese in tumorcellen om tumorgroei te ondersteunen. Daarnaast blijkt de UPR betrokken te zijn bij veel oncologische processen zoals oncogenese, het metastatisch potentieel, genomische stabiliteit, stamcelstatus, angiogenese, immunogene tolerantie en metabole status van tumorcellen. Dit heeft

het onderzoek naar de UPR als mogelijk therapeutische doelwit geïntensiveerd. In GBM is aangetoond dat de UPR betrokken is bij tumorgroei en therapieresistentie. Gegevens over het belang van de UPR bij de therapiegevoeligheid en regulatie van stamceleigenschappen van GSC ontbreekt grotendeels.

Het belangrijkste doel van dit proefschrift was om het belang van de UPR te onderzoeken bij het in standhouden van GSC, de onderliggende mechanismen te bestuderen en mogelijkheden voor gerichte therapie te exploreren.

**Hoofdstuk 1** geeft een algemene inleiding over GBM, GSC en de therapeutische problemen bij de behandeling van GBM. De UPR wordt geïntroduceerd als een mogelijk doelwit voor therapie bij kanker en met name voor GBM. Verder wordt het doel en de hoofdlijnen van het proefschrift beschreven.

**Hoofdstuk 2** geeft een literatuuroverzicht van de huidige kennis m.b.t. het functioneren van de UPR en de rol van de UPR bij GBM alsmede de therapeutische mogelijkheden. Bij verschillende soorten kanker is gevonden dat UPR-signalering tumorgroei, therapiegevoeligheid en tumorprogressie reguleert. Gegevens over de rol van de UPR in de regulatie van GSC ontbreekt grotendeels. Dit proefschrift probeert deze kenniskloof te vullen en richt zich met name op de betrokkenheid van ER-stress en de UPR bij het in stand houden van GSC.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we een studie naar de rol van ER-stress en de UPR activatie in GBM. We hebben de mogelijke prognostische waarde van UPR markers in GBM tumormateriaal van patiënten onderzocht. De eiwit expressie van GRP78/ BIP, XBP1 en ATF4 werden immunohistochemisch bepaald gebruikmakend van een weefsel-microarray (GBM TMA). Hoge ATF4-niveaus bleken te correleren met slechtere prognose, hetgeen duidt op het belang van de PERK-route in deze context. Gevoeligheid voor ER-stress werd bestudeerd in onze GSC-verrijkte GBM-neurofeermodellen en hun serum-gedifferentieerde tegenhangers, waarbij vooral GSC gevoelig bleken voor ER stress. De reguliere (canonieke) PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 route was de belangrijkste signaleringsroute bij het induceren van ER-stress cytotoxiciteit. ER-stress bleek ook het zelfvernieuwingspotentieel van GSC krachtig te remmen. Deze remming gaat gepaard met downregulatie van de stamceltranscriptiefactor SOX2 op eiwitniveau. Dit werd gemedieerd door PERK maar vereiste geen eIF2 $\alpha$  of ATF4. Genetische ablatie van PERK in GBM-neurosferen resulteerde in verminderde differentiatie, wat aangeeft dat door differentiatie geïnduceerde veranderingen in

eiwit expressie ook PERK-signalering vereisen om homeostase te bewaren. Een nieuw niet-canoniek mechanisme is dus ontdekt waarbij PERK SOX2 expressie en stamceleigenschappen van GSC reguleert. We concluderen dat ER stress-inducerende therapieën en PERK-modulatie veelbelovende therapeutische benaderingen kunnen zijn voor GBM.

In de bijlage van hoofdstuk 3 wordt de rol van de hypoxiemarker GLUT1 nader beschreven en de gebruikte digitale beeldanalyse voor het kwantificeren van de UPR marker expressie toegelicht. De expressie van GLUT1 werd bepaald in de GBM TMA en gecorreleerd met expressie van de UPR markers. De aanwezigheid van hypoxische gebieden is kenmerkend voor GBM en zuurstoftekort is eerder in verband gebracht met UPR-activering. We vonden geen correlatie tussen GLUT1-expressie en algehele overleving van patiënten, maar vonden wel een significante co-expressie tussen GLUT1 en nucleair XBP1, wat een verband suggereert tussen hypoxie en UPR-activering. De gebruikte digitale beeldanalyse voor de kwantificering van UPR-markerexpressie bleek de objectiviteit, reproduceerbaarheid en kwantificering van scores te verbeteren.

In **hoofdstuk 4** hebben we onderzocht of farmacologische PERK-remming met GSK2606414 (GSK414) of PERK genetische knock-out in afwezigheid van acute ER-stress een effect had op het zelfvernieuwingspotentieel van GSC. PERK bleek GSC te reguleren, deze keer in afwezigheid van SOX2-downregulatie, hetgeen een ander mechanisme suggereert dan bij acute ER-stress (of differentiatie) geïnduceerde remming van zelfvernieuwing (hoofdstuk 3). Om onderliggende mechanismen te identificeren, werden transcriptie profielen gemaakt en onderling vergeleken. GSK414 behandelde GBM-neurosfeermodellen (GG16 (ER-stress gevoelig) en GSC23 (ER-stress ongevoelig) lieten slechts een beperkt aantal differentieel tot expressie gebrachte genen (DEGs) zien. Vervolgens werden DEGs geïdentificeerd in GBM-neurosferen en vergeleken met serum-gedifferentieerde tegenhangers om genen te identificeren die mogelijk betrokken zijn bij in stand houden van GSC en differentiatie. Een groot aantal DEGs werd gevonden en GO-analyses van GG16 DEG's lieten verlaging van GTPase- en RAS-siginaaltransductie, sterol / cholesterol-biosynthese en actine-cytoskelet-gerelateerde processen zien, terwijl processen gerelateerd aan eiwittranslatie en ER-eiwit transport omhoog gingen. In GSC23 gingen chromatine- en histon-modificatieprocessen, peptidyl-threonine-modificaties

en (neurale) ontwikkelingsprocessen omlaag, en elektrontransportketenprocessen, extracellulaire matrixorganisatie en cytokine- en immuungerelateerde processen omhoog. Onderlinge vergelijking van de GG16 en GSC23 DEGs liet ongeveer 25% overlapping zien, hetgeen duidt op heterogeniteit in de response op serumgeïnduceerde differentiatie. Gene set enrichment analyses (GSEA) van de overlappende DEGs lieten een verlaging zien van G2 / M celcyclus en mitotische spindelregulatiemechanismen, androgeen- en oestrogeenreacties, en TNF $\alpha$ , MTORC, KRAS en IL2 / STAT5-signalering. DEGs geassocieerd met inflammatie, interferon gamma- en alfa-responsen en epitheliale-mesenchymale overgang (EMT) gingen omhoog. Ten slotte werden overlappende DEGs van de GSK414-behandelde en serum-behandelde datasets vergeleken. Alleen in GG16 werden verschillen gevonden, 7 DEGs gingen omlaag en 23 omhoog. GSEA liet een verhoging van de overlappende DEGs zien geassocieerd aan apoptose, EMT en TNF-signalering. *CD44* en *Tenascin-C (TNC, extracellular matrix glycoprotein)* behoorden tot de DEGs die door zowel PERK-remming als differentiatie worden gereguleerd en kunnen interessante kandidaten zijn voor verder onderzoek. Samengevat, het vergelijken van transcriptonele profielen leverde enkele mechanistische aanwijzingen op voor PERK-afhankelijke regulering van GSC. Het effect van PERK-remming in afwezigheid van acute stress op transcriptie was echter klein en geeft aan dat PERK effecten op eiwitniveau ook moet worden onderzocht om nader inzicht te krijgen in onderliggende mechanismen.

In **hoofdstuk 5** ligt de focus op de mogelijke bijdrage van autofagie bij het handhaven van cellulaire homeostase in de GBM-neurosfere modellen en hun serumgedifferentieerde tegenhangers. Behandeling met de ER-stress activator thapsigargin resulteerde in een tijdafhankelijke toename van autofagie - en apoptotische markers. Activatie van autofagie bleek niet te verschillen tussen neurosferen en serumgedifferentieerde tegenhangers. Thapsigargin had variabele effecten op de autofagie flux en gelijktijdige behandeling met autofagie-remmer BafA1 versterkte thapsigargingeïnduceerde cytotoxiciteit in de GBM-modellen, maar bereikte slechts significantie in 1 van de 3 geteste neurosfere modellen. Transcriptie profielen van neurosfeer en gedifferentieerde tegenhangers werden vervolgens vergeleken. Lagere niveaus van genen betrokken bij autofagosoomvorming werd gevonden in neurosferen. Dit suggereert een grotere afhankelijkheid van autofagie voor celoverleving in de

GBM-neurosferen. Deze preliminaire studie laat zien dat ER-stress inductie leidt tot activatie van autofagie in de alle geteste GBM-modellen met een mogelijk sterkere afhankelijkheid van GBM-neurosferen (GSC) voor autofagie-afhankelijke overleving t.o.v. gedifferentieerde tegenhangers. Nader onderzoek is nodig om deze bevindingen te onderbouwen en de relevantie van autofagie voor het in standhouden van GSC aan te tonen.

Concluderend, heeft dit onderzoek meer inzicht verschaft over de rol van de UPR en met name PERK bij de regulatie van GSC. Een nieuwe mechanisme werd ontdekt waarbij PERK zowel via SOX2 als via een nog onbekende route stamceleigenschappen van GSC reguleert. De implicaties voor mogelijke therapeutische toepassing van ER stress of UPR doelgerichte therapie dient nader onderzocht te worden.





## Acknowledgements

Promotor Prof. dr. F.A.E. Kruyt, dear Frank thank you for giving me the opportunity to do a PhD. I learned a lot scientifically and I hope our contribution helps a bit to improve treatment of GBM.

Co-promoter dr. J. Meijer, dear Coby thank you for all your support and input through the whole process. You taught me the importance of being critically detailed when you do science.

I would like to thank the members of the reading committee, Prof. dr. H.H. Kampinga, Prof. dr. J.M.C. van Dijk and Prof. dr. L.J. Braakman, for evaluating my thesis.

I thank Colciencias for financial support of my PhD project. To Prof. dr. Han Moshage, for making me acquaintance with the University of Groningen and his efforts to get me into contact with Frank. He always was helpful with the paperwork for Colciencias.

I would like to acknowledge the Jan Kornelis de Cock Stichting Foundation for the additional financial support, which allowed me to expand the experimental possibilities.

To Prof. dr. Steven de Jong, dr. Bea Wisman and Prof. dr. Marcel van Vugt for your input during some presentations that enriched the project. Steven you were always friendly and I admire the passion you have to do research.

Thanks to Frank's research group members; Ingrid, Birgit and Lieske you made me feel super welcome when I arrived in Groningen. Thank you Justin, Milind, Roelien and Tushar for your input in the lab and our updates sessions. Margot, Anne, Kevin and Win Sen we shared the PhD experience and it was very nice to work with you.

Thank you to dr. W.F.A. den Dunnen, Siobhan and Tineke from the pathology Lab. Wilfred every time we had a meeting, I learned new things. Siobhan thank for your support you were always kind when I had questions.

To Hetty, I believe that without your work and Coby's the lab couldn't work well. Thank you for the input and attention in the updates meetings and joining lunches in the coffee room with us.

Thanks to all of the lab technicians Gert Jan, Wytske, Roland, Phuong, Linda,

Esmeé, Nathalie, Elles, Neeltje and Nienke. The ordering ladies Meta and Tiny. Harm Jan, our small talks in the lab were interesting and fun.

To Geert, Henk, Wayel and Johan from the FACS facility, you were always kind helping me doing short or super long cells sorting sessions.

To my office mates Joost, Marloes, Rico and Thijs. It was nice to share some relaxing time with you in the office.

To the students that I had supervised Maarten, Sara, Francesca, Cristian, Joost, Lisette and Bianca. I hope you could learn something from me as I did from you and the supervising experience. Bianca thank you for your extra help with the cells and extra experiments. I wish you all the best with your career.

To all the colleagues Gerda, Stephanie, Elly, Ines, Frans, Danique, Arjan, Pepijn, Stijn, Sergi, Colin, Francine, Joyce, Anne Magriet, Rolf, Yannik, Linda and Nathalie.

To the PhD Day committee members Zsofia, Anne Claire, Heleen, Annarita, Nico, Hataitip, Anna, Sanne and Brian. We were a great team making possible the PhD day. It was a gratifying experience.

From earlier times, thanks to the scientific inspiration of dr. Silvia Restrepo and dr. Adriana Bernal in Los Andes University, Bogotá. To my master supervisors Prof. Carlos Jaramillo and Pilar Delgado that helped me to get the scientific skills before the PhD.

To the Colombian and Mexican friends: Ximena, Aleja, Mago, Paola, Mariana, Jose, Lili, Raul and Marty, we shared nice trips, concerts, dinners, drinks and laughs. Raul thanks a lot for your help with one of the chapters in my thesis. I know you will have a bright future in your career. Ximena we were together in the department during the whole PhD time, thanks for all the support and we made the coffee room popular in the department!

To my mom, dad and brother thank you for supporting me from far away and trying to understand what I do in scientific research.

To my lovely and spectacular husband, thank you for supporting my idea to pursue a PhD from the beginning, to be there in all good and bad moments, from the distance or semi-close. You kept supporting me through this whole adventure.



## About the autor

Natalia M. Peñaranda Fajardo was born on the 29<sup>th</sup> of October 1988 in Barrancabermeja, Colombia. She completed her higher secondary school at Bogotá, Colombia in 2005 focusing in Biology. After that during her bachelor studies she start her research work during her bachelor thesis at the Laboratory of Molecular Diagnostics and Bioinformatics on the DNA characterization of CagA-positive *Helicobacter pylori* strains. She received her bachelor degree in Microbiology from Los Andes University (Bogotá, Colombia) in 2010. Under the supervision of Carlos Alberto Jaramillo and Maria del Pilar Delgado she continued her master program. The main aim of her master project was to characterize the virulent factor CagA from *Helicobacter pylori* and establish the relation of the protein characteristics and the gastrointestinal pathology of the patients. In 2012 she received her MSc degree in Biological Sciences, area Microbiology. In April 2014 Natalia started her PhD at the University of Groningen, The Netherlands. She joined the Department of Medical Oncology and carried out her PhD research under the supervision of Prof. dr. Frank AE Kruyt. Her research focused on understanding the role of the Unfolded Protein Response signals in Glioblastoma stem cell population. Currently, Natalia is exploring her future career path.



## List of publications

- Krabbendam IE, Honrath B, Bothof L, Silva-Pavez E, Huerta H, **Peñaranda Fajardo NM**, Dekker F, Schmidt M, Culmsee C, César Cárdenas J, Kruyt F, Dolga AM. SK channel activation potentiates auranofin-induced cell death in glio- and neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2020 Jan.
- **Peñaranda-Fajardo NM**, Meijer C, Liang Y, Dijkstra BM, Aguirre-Gamboa R, den Dunnen WFA, Kruyt FAE. ER stress and UPR activation in glioblastoma: identification of a noncanonical PERK mechanism regulating GBM stem cells through SOX2 modulation. *Cell Death Dis*. 2019 Sep.
- **Peñaranda Fajardo NM**, Meijer C, Kruyt FAE. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. *Biochem Pharmacol*. 2016 Oct.
- Joseph JV, van Roosmalen IA, Busschers E, Tomar T, Conroy S, Eggens-Meijer E, **Peñaranda Fajardo N**, Pore MM, Balasubramanyian V, Wagemakers M, Copray S, den Dunnen WF, Kruyt FA. Serum-Induced Differentiation of Glioblastoma Neurospheres Leads to Enhanced Migration/Invasion Capacity That Is Associated with Increased MMP9. *PLoS One*. 2015 Dec.
- Delgado P, **Peñaranda N**, Zamora MA, del Pilar Delgado M, Bohorquez E, Castro H, Barrios AF, Jaramillo C. Computational approaches for evaluating the effect of sequence variations and the intrinsically disordered C-terminal region of the *Helicobacter pylori* CagA protein on the interaction with tyrosine kinase Src. *J Mol Model*. 2014 Aug.