

University of Groningen

Exploiting genomic instability as an Achilles' heel in cancer

Guerrero Llobet, Sergi

DOI:
[10.33612/diss.168484998](https://doi.org/10.33612/diss.168484998)

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:
2021

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

Citation for published version (APA):
Guerrero Llobet, S. (2021). *Exploiting genomic instability as an Achilles' heel in cancer*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.168484998>

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.

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae and Publications

Acknowledgements

Appendix

Nederlands samenvatting

In de afgelopen 50 jaar hebben onze toegenomen kennis over tumorbiologie, de uitgebreide genomische karakterisering van tumoren en de ontwikkeling van innovatieve detectiemethoden geresulteerd in een reeks effectieve behandelingen gericht op tumorcellen, en zijn ze cruciaal geweest voor het verlengen van de levensverwachting van bepaalde groepen patiënten met kanker. Een duidelijk voorbeeld hiervan is dat borsttumoren die de oestrogeen- (ER), progesteron- (PR) of HER2-receptoren tot expressie brengen, effectief kunnen worden behandeld met hormonale therapie of moleculair gerichte geneesmiddelen.

Niet voor alle tumorsubtypen zijn echter vergelijkbare effectieve behandelingen ontwikkeld. Bijvoorbeeld, zogenaamde triple-negatieve borstkankers (TNBCs), worden gekenmerkt door afwezigheid van de ER/ PR en HER2-receptoren, en patiënten met TNBC hebben geen baat bij hormonale of gerichte middelen. Deze patiënten zijn daarom afhankelijk van behandelingen met chemotherapie en / of radiotherapie.

Veel moeilijk te behandelen kankers, waaronder TNBCs maar ook hoog-gradige sereuze ovariumcarcinomen (HGSOC's), worden gekenmerkt door hun verhoogde replicatiestress. Replicatiestress (RS) wordt gedefinieerd als het vertragen van DNA-duplicatie en kan worden veroorzaakt door overexpressie van oncogenen, zoals Cyclin E1, Cdc25A of c-Myc. De ophoping van DNA schade geïnduceerd door RS kan leiden tot het afbreken van de replicatievork en kan vervolgens de genoomstabiliteit in gevaar brengen, wat de heterogeniteit van de tumor en resistentie van de behandeling tot gevolg kan hebben. Om DNA schade tijdens replicatie te kunnen repareren, hebben cellen een complexe DNA schade respons (DNA damage response 'DDR') ontwikkeld die de voortgang van de celcyclus stopt en DNA schade herstelt. Om de door RS-geïnduceerde DNA schade te repareren, kunnen dergelijke kankercellen voor hun overleving afhankelijk worden van adaptieve

mechanismen, waaronder eiwitten die betrokken zijn bij de DDR.

De ontwikkeling van geneesmiddelen die centrale DDR checkpoint kinases inactiveren (waaronder WEE1 and ATR), opent mogelijkheden om tumoren te behandelen die gekenmerkt worden door verhoogde RS niveaus. Om zulke behandelingen voor tumoren met hoge RS niveaus te ontwikkelen en optimale selectietools te ontwerpen om deze patiënten te identificeren, hebben we eerst een nauwkeurig en uniform systeem nodig om RS te meten en om tumoren met hoge RS niveaus te kunnen identificeren.

De doelstellingen van het onderzoek beschreven in dit proefschrift waren daarom:

1. Het identificeren van oncogenen die geassocieerd zijn met verhoogde niveaus van RS in tumor weefsel.
2. De cellulaire gevolgen van oncogen-geïnduceerde RS ontrafelen, en de therapeutische mogelijkheden in kaartbrengen die daarmee gepaard gaan.
3. Tumoren met hoge niveaus van RS identificeren.

In **hoofdstuk 1** wordt een algemene inleiding gegeven en het doel van dit proefschrift besproken.

Hoofdstuk 2 beschrijft een literatuurstudie. we bespreken eerst hoe normale DNA replicatie op moleculair niveau wordt gereguleerd. Vervolgens hebben we de oncogene veranderingen samengevat die replicatiestress en chromosomale instabiliteit kunnen veroorzaken, en hebben we de mechanismen besproken die cellen gebruiken om replicatiestress in de celcyclus aan te pakken. Daarnaast bespreken we verschillende strategieën die zich richten op therapeutische aangrijpingpunten van tumoren met hoge niveaus van replicatie stress, met name gericht op celcyclus checkpoint kinases, geoxideerde nucleosiden, DNA-resolvases en immuun checkpoints.

Replicatiestress wordt algemeen bestudeerd in experimentele modellen. Om therapeutische benaderingen te ontwikkelen voor tumoren met verhoogde niveaus van RS, is het nodig om in kaart te brengen hoe oncogene expressie geassocieerd is

met RS in klinische samples. Hiertoe hebben we in **hoofdstuk 3** bestudeerd of en hoe oncogene veranderingen geassocieerd zijn met niveaus van RS in borstkanker weefsels van 384 patiënten. Specifiek hebben we de relatie geanalyseerd tussen de immunohistochemische expressie van oncogenen (Cyclin E1, Cdc25A en c-Myc) en RS markers (pRPA en γ -H2AX) in klinisch relevante borstkanker subtypes. We ontdekten dat triple-negatieve borstkankermonsters, die het hoogste niveau van genomische instabiliteit laten zien, ook de hoogste niveaus van RS vertoonden. Bovendien werd aangetoond dat nucleaire Cyclin E1-expressie geassocieerd is met RS, vooral in TNBC's. Samengevat wijzen onze bevindingen op Cyclin E1 als een potentiële biomarker om patiënten te selecteren voor behandeling met cel cyclus checkpoint remmers, zoals WEE1 en ATR remmers, die zich richten op RS.

In **hoofdstuk 4** hebben we onderzocht wat de effecten zijn van checkpoint kinase remming op tumorcellen met oncogen-geïnduceerde RS. Om dit te doen, hebben we eerst experimentele modellen gemaakt met doxycycline-induceerbare oncogen-gemedieerde replicatiestress. Specifiek hebben we overexpressie van Cyclin E1 of Cdc25A geïnduceerd, wat zoals verwacht een langzamere DNA-replicatiesnelheid veroorzaakte. Vervolgens hebben we onderzocht of oncogen-geïnduceerde RS de segregatie van chromosomen tijdens mitose en de stabiliteit van het genoom negatief beïnvloedde. We vonden inderdaad dat mitotische defecten en genomische instabiliteit werden veroorzaakt door de accumulatie van DNA schade afkomstig van RS. Interessant is dat de remming van ATR of WEE1 deze mitotische afwijkingen verergerde, de genomische instabiliteit verhoogde en celdood veroorzaakte in de gebruikte modellen van oncogen-geïnduceerde RS. Concluderend ondersteunen onze bevindingen het gebruik van Cyclin E1-overexpressie als criterium voor de selectie van patiënten voor behandeling met WEE1- en ATR-remmers.

Om de niveaus van RS in tumormateriaal te meten, is het nodig om de generieke effecten van oncogen-geïnduceerde replicatiestress te identificeren. Een benadering om dit te bereiken is de analyse van oncogen-geïnduceerde mRNA-expressieveranderingen en het identificeren van gemeenschappelijke effecten van een groot panel van oncogenen. Daarom hebben we in **hoofdstuk 5** een op mRNA-expressie gebaseerde 'vingerafdruk' ontwikkeld van door oncogen-geïnduceerde replicatiestress. Met behulp van een panel cellijnen hebben we waargenomen dat de inductie van RS in resulteerde in 52 gemeenschappelijke opgereguleerde genen, zoals gemeten door RNA-sequentieanalyse. Interessant genoeg werden 6 van de 52 opgereguleerde genen vaak tot overexpressie gebracht in genexpressiegegevens van 10.592 van patiënten afkomstige tumormonsters. Vervolgens hebben we onze 'RS vingerafdruk' van zes genen gebruikt om de niveaus van RS in tumoren van patiënten te classificeren met behulp van 8.862 RNAseq-monsters van het TCGA cohort en 13.912 microarray-monsters van het GEO cohort. Ten slotte hebben we NAT10, een van de genen uit onze RS- vingerafdruk, gevalideerd in klinische monsters van borstkanker. Onze immunohistochemische analyses bevestigden dat NAT10 geassocieerd was met RS. We concluderen dat onze RS-vingerafdruk een valide methode is om tumoren te categoriseren op basis van hun RS-niveaus, en kan helpen om patiënten te selecteren die mogelijk baat hebben bij behandeling met WEE1- en ATR-remmers.

Curriculum Vitae

Name: Sergi Guerrero Llobet
Date of birth: 5 January 1989
Birthplace: Barcelona, Spain
E-mail: sergibiotec@gmail.com

Scientific education

February 2015 - May 2019 **PhD research**
 Department of Medical Oncology, Universitat Medisch Centrum Groningen
 Thesis: "*Exploiting genomic instability as an Achilles' heel in cancer*"
 Promotor: Prof. Marcel A.T.M. van Vugt
 Co-promotor: Prof. R.S.N. Fehrmann

October 2013 - August 2014 **Master thesis**
 Oncology and Pathology Group, Vall d'Hebron Institute of Research, Barcelona
 Thesis: "*miR-99a reveals two novel oncogenic proteins E2F2 and EMR2 and represses stemness in lung cancer*"
 Secondary project: "*RPLP1, a crucial ribosomal protein for embryonic development of the nervous system*"

February 2013 - May 2013 **International undergraduate internship**
 Department of Crop Sciences, Division of Plant Protection, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna
 Project: "*Testing in vitro antimicrobial activity of Thi2.3 pro domain from Arabidopsis thaliana expressed in E. coli*"

June 2011 - September 2011 **Undergraduate internship**
 Biomedical and Translational Oncology Group, Vall d'Hebron Institute of Research, Barcelona
 Project: "*Characterization of the rare side population stem cells*"

Education

2013 - 2014 **Master of Science (MSc) in Biomedical Research**
 Universitat Pompeu Fabra

2008-2013 **Bachelor of Science (BSc) in Biotechnology**
 Universitat de Vic

Publications

- S Guerrero Llobet***, A Bhattacharya*, M Everts, et al. An RNA expression-based signature for oncogene-induced replication-stress. *Submitted*.
- S Guerrero Llobet***, Y Kok*, PM Schoonen*, et al. Overexpression of Cyclin E1 or Cdc25A leads to replication stress, mitotic aberrancies and increased sensitivity to replication checkpoint inhibitors. *Oncogenesis*, 2020.
- S Guerrero Llobet**, B van der Vegt, E Jongeneel, et al. Cyclin E expression is associated with high levels of replication stress in triple-negative breast cancer. *Npj Breast Cancer*, 2020.
- B Benedict, MA van Bueren, ..., **S Guerrero Llobet**, et al. The RECQL helicase prevents replication fork collapse during replication stress. *Life Science Alliance*, 2020.
- S Guerrero Llobet***, PM Schoonen*, MA van Vugt. Replication stress: Driver and therapeutic target in genomically instable cancers. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 2019.
- E Gogola, AA Duarte, ..., **S Guerrero Llobet**, et al. Selective Loss of PARG Restores PARylation and Counteracts PARP Inhibitor-Mediated Synthetic Lethality. *Cancer Cell*, 2018.
- WW Zomeran, SLA Plasschaert, ..., **S Guerrero Llobet**, et al. Identification of two protein-signaling states delineating transcriptionally heterogeneous human medulloblastoma. *Cell Reports*, 2018.
- S Guerrero Llobet***, HR de Boer*, MA van Vugt. Controlling the response to DNA damage by the APC/C-Cdh1. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015.
- L Perucho, A Artero-Castro, **S Guerrero Llobet**, et al. RPLP1, a crucial ribosomal protein for embryonic development of the nervous system. *PLoS One*, 2014.

*These authors contributed equally

Acknowledgments

In the process of seeking for a PhD position I had the pleasure to meet Prof. Marcel van Vugt, who invited me to Groningen for an interview.

When I arrived in Groningen, I fell in love with the architecture and the atmosphere of the city. I had the opportunity to present my master's thesis in front of Prof. Marcel van Vugt's research group, and received interesting questions which led to a constructive discussion. I left the room energized because the group was full of smart and professional scientists who were able to find weaknesses on my previous projects. Prof. Marcel van Vugt asked me privately to draw the cell cycle pathways and he illustrated me where replication stress had to be addressed and how he wanted to project his ideas. Since the projects were fascinating and I also found that the facilities of the UMCG were excellent, I realized that Groningen was the place where I wanted to work as a scientist.

Dear **Prof. Marcel van Vugt**, I would like to thank you for supervising me all of these years, to shape my presentation skills, to give me the opportunity to expand my work on replication stress from different angles and collaborations. I learned several soft and hard skills from you in our weekly meetings. You warned me from the beginning that failures are part of the learning process and can be frustrating. Thanks to you I understood that the scientific path is made for tough people because it generally does not follow a straight line, it contains obstacles and curves, which makes it more complex and exciting. I can smile at every figure and text because I remember the amount of hard work and failed experiments that had to be done previously. I will always keep with me all the successes and good memories that we shared together.

Dear **Prof. Rudolf Fehrmann**, it has been a pleasure for me to have you as a co-promotor. Your critical comments and suggestions during the meetings were useful to improve the statistical analyses, and your expertise in bioinformatics provided a bigger picture of the experimental data in chapters 3, 4 and 5.

I would like to express my gratitude to the members of the reading committee, **Prof. Steven de Jong**, **Prof. R. Brakenhoff** and **Prof. Floris Foijer** for their dedication in reading and evaluating my thesis.

Dear **Prof. Bert van der Vegt** and **Prof. Truuske de Bock**, thank you for supervising my analyses in chapter 3, together with **Prof. Marcel van Vugt**. Your comments, suggestions and indications were extremely valuable for me. The final revision of chapter 3 occurred when Typhoon Faxai struck Japan while I was at the airport of Tokyo surrounded by terrified and hysterical people. Conversely, I was happy because I had the entire night to follow your neat indications to perform the final analyses and submit our findings. I had the pleasure to receive feedback from 3 fantastic professors with different backgrounds and I will always be grateful to you.

Dear **Evelien**, your advices and indications as a pathologist were crucial to speed up the scoring of the expression of replication stress markers and oncogenes on tumor tissues in chapter 3.

Dear **Rico**, thank you for your suggestions on the multivariate analyses and for providing additional data from TCGA at the mRNA level in chapter 3.

Dear **Mieke**, since I am not a pathologist I want to thank you for clarifying my doubts related to the morphology of some cancer cells. You have always been kind to me and I want to express my gratitude for your contribution to chapter 3.

Dear **Arko**, working with you has always been easy and exciting, since our expertise complemented each other. You performed a beautiful job based on bioinformatics for chapters 4 and 5, and I want to thank you for your professionalism and hard work.

Dear **Pepijn**, it was an honor for me to share with you chapters 2 and 4. My motivation was amplified by you when I was working long hours in the lab and I realized that you were also there, trying to make massive experiments and curious about the outcome. You taught me how to visualize and analyze DNA fibers and gave me useful tips. Thank you Pepijn, for working hard, for your implication in the discussions and I wish you the best in your career and life. I am sure that you are the best daddy in the world.

Dear **Yannick** and **Nathalie**, thank you for your time and dedication to complete the final experiments of the last revision of chapter 4 when I left the lab, your work was decisive.

Dear **Rolf**, thank you for sharing with me your thesis layout, it simplified a lot the thesis edition. I drank the first beer in Groningen with you, while you explained me exciting stories about the lab. You fueled my motivation to start working immediately. Thank you for all the wise tips and advices that you gave me in the lab, I appreciate them a lot.

Dear **Elles**, choosing you as a paronymph was the easiest choice in the world. As a technician you are skilled, proactive, energetic and enthusiastic. Your advices and help always accelerated my experiments and reduced the complexity of the bureaucracy. It was a pleasure for me to share the office and the lab with you all of these years. Thank you for all the science and good memories.

Dear **Marieke**, thank you for your performing clean immunoblots and MTTs, for scoring with me a huge amount of TMA cores. You are a skilled technician and your contribution was crucial to complete chapters 3 and 4.

Dear **Erik** and **Annika**, thank you for working hard on the experiments that we designed, to be honest with your mistakes and professional presenting your findings. I am proud of you and it was a pleasure to supervise you.

Dear **Femke**, thank you for your accuracy, dedication and professional attitude to perform the experiments. Your results served as a starting point for chapter 4 and reduced the time of optimization of the MTTs. I enjoyed co-supervising you with **Pepijn** and **Prof. Marcel van Vugt**.

I would also like to thank **Prof. Frank Kruyt** and **Dr. Bea Wisman** for their critical and constructive feedback to my presentations during Monday and Tuesday meetings.

The organization of the lab was one of the things that impressed me when I arrived in Groningen. This is thanks to **Coby** and **Hetty**, the managers of the lab, who were also kind and helpful to me from the beginning.

Dear technicians, PhD students and postdocs of the DNA damage group: **Hylke, Anne Margriet, Inês, Esmée, Rolf, Pepijn, Stephanie, Marieke, Elles, Francien, Yannick, Colin, Nathalie, Vivian** and **Mauritis**, thank you for your cooperation in the lab and for your suggestions and discussions during the meetings. Your professionalism helped me to improve every strategy, technique and analysis.

I would also like to thank **Arko, Rico, Carlos** and **Vincent** for your implication during the meetings. It was useful to have a profound statistical and bioinformatic point of view to analyze the data.

I had the pleasure to be in the coolest and sometimes coldest office in the department with **Elles, Marieke, Stijn, Yannick, Gerke, Phoung, Hylke** and **Xiao Yung**. I enjoyed your company, support, advices and jokes.

Dear members of the **Biergenootschap M.O.L: Arjan, Arko, Frans, Hylke, Pepijn, Rolf, Rico, Joost, Stijn, Martin, Thijs** and **Yannick** thank you for all the moments that we enjoyed together: having dinner, drinking beers, going to the cinema, watching football matches and joking in the chat. It is an honor for me to be part of the **Biergenootschap M.O.L**. I learned from you how to properly identify Illuminati and the importance of adding a massive amount of bacon strips in every meal.

I would also like to thank Groningen, a wonderful city full of clever students where I accomplished my dream of becoming a scientist. In the path of obtaining a PhD in molecular biology I made a lot of friends, memories, and I will always keep you and the Netherlands in my heart.

Vull agrair a cada amic i membre de la família **Guerrero, Llobet, Vaz** i **Buxarrais** el vostre recolzament durant el doctorat tot i els quilòmetres que ens separaven.

Tiet **Marc**, des de petit ets el meu referent acadèmic i he seguit els teus passos a través del camí que vas traçar. Sempre t'estaré agraït per estimular-me intel·lectualment i recolzar-me quan no trobava una posició com a doctorant que encaixés amb el meu perfil. Per a mi ha estat un honor que acceptéssis ser el meu paranimf i poder compartir amb tu el desenllaç de la meva carrera científica.

Arnau, valoro molt que m'ajudéssis a preparar les entrevistes per videotrucada per aconseguir la posició com a doctorant. Vas tenir el coratge d'ajudar-me tot i saber que si sortien bé, deixaríem de viure plegats

Papa i mama, aprecio molt els esforços que heu fet perquè poguéssis tenir una bona educació. Gràcies per ser flexibles i recolzar-me en el camí que vaig triar. **Papa**, vas aconseguir que no em conformés acadèmicament, que posés el llistó més alt, i vas evitar que em desviés del camí ensenyant-me vídeos de físics frikis quan dubtava entre estudiar astrofísica i biotecnologia. **Mama**, gràcies per ensenyar-me a ser proactiu, pragmàtic i murri. Gràcies per ser la meva primera fan incondicional i escoltar-me quan projectava en el cel estrellat els meus somnis.

Ari, gràcies per acompanyar-me en aquesta aventura a l'estranger, abandonant temporalment la llengua, les tradicions i la tranquil·litat de viure a prop de la família i dels amics. M'enduc eternament les nits que sopàvem plegats a l'UMCG per acabar experiments i la teva precisió al repassar cada peça de text i figura científica. Gràcies per tots els moments màgics que

m'has regalat recorrent els fiords noruecs, els glaciars i les cascades islandeses. Si tanco els ulls recordo l'olor del bosc d'Arashiyama i la pluja monsonica mentre suràvem a la piscina de les illes Phi Phi. Cada moment al teu costat ha estat únic i irrepètible, t'estimo.