

# Hypoxia-induced metastasis : the role of the unfolded protein response

## Citation for published version (APA):

Mujcic, H. (2013). *Hypoxia-induced metastasis : the role of the unfolded protein response*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2013

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Samenvatting

Klinische studies in verscheidene soorten kanker hebben een sterke associatie aangetoond tussen hypoxie en het risico op uitzaaiing van kanker (metastasering) (1-3). Er bestaat bovendien een overvloed aan bewijs verkregen uit experimentele studies voor een rol van hypoxie bij metastasering (4-7). Echter, de signaaloverdrachten die plaatsvinden binnen kankercellen en die metastasering bevorderen tijdens hypoxie zijn op dit moment nog niet goed bekend. Dit proefschrift beschrijft hoe de signaaloverdrachten die via het unfolded protein response (UPR) plaatsvinden, bijdragen aan hypoxie-gereguleerde metastasering, en ook het algemene belang van het UPR in kanker.

Tijdens onze voortdurende zoektocht naar nieuwe hypoxie-gereguleerde genen hebben we microarray technologie toegepast om transcriptionele veranderingen tijdens hypoxie in kaart te brengen, en daarbij hebben we lysosomal associated membrane protein 3 (LAMP3) ontdekt, een gen dat al eens eerder met metastasering in verband is gebracht (8). In de studie die beschreven staat in Hoofdstuk 3 van dit proefschrift hebben we gedemonstreerd dat de gen expressie van LAMP3 wordt geïnduceerd door strenge hypoxie in meerdere kanker cellijnen, inclusief baarmoederhals (cervix), borst en dikkedarmkanker. We hebben laten zien dat in tegenstelling tot de meeste andere hypoxie-geïnduceerde genen die in verband zijn gebracht met metastasering tot nu toe, LAMP3 niet wordt gereguleerd door HIF1, maar geïnduceerd wordt door het UPR op een PERK, eIF2 $\alpha$ , en ATF4-afhankelijke wijze. We hebben ook overexpressie van LAMP3 in borstkanker vastgesteld, en laten zien dat dit gen geïnduceerd wordt in tumoren die behandeld zijn met het anti-angiogenese geneesmiddel bortezomib (Avastin). Dit is consistent met de inductie van hypoxie en het UPR in deze tumoren na het therapeutisch beschadigen van het tumorvaatbed. De resultaten gepresenteerd in Hoofdstuk 3 suggereren dat LAMP3 mogelijk betrokken is bij hypoxie-gereguleerde metastasering.

Om de bijdrage van UPR en LAMP3 inductie door hypoxie tot metastasering te bepalen, hebben we hun rol bij hypoxie-gemedieerde cel migratie en invasie in borstkanker onderzocht (Hoofdstuk 4). Door middel van twee verschillende *in vitro* cel migratie assays hebben we kunnen aantonen dat siRNA-gemedieerde knockdown van PERK, ATF4 of LAMP3 aanzienlijk de migratiecapaciteit van borstkankercellen verminderde tijdens hypoxie. Dit effect was niet het resultaat van verminderde overleving van cellen tijdens hypoxie na de knockdown. Zoals verwacht hebben we geen enkele verschil in cel migratie gezien toen de assays werden uitgevoerd onder normoxie. Als een tweede *in vitro* model van tumor hypoxie hebben we multicellulaire sferoïde culturen afkomstig van borstkanker cellijnen tot stand gebracht. Multicellulaire sferoïden hebben een necrotische

kern die omgeven wordt door hypoxische cellen. We hebben de aanwezigheid van hypoxische cellen in de kern van de sferoïden aangetoond door middel van immunohistochemische kleuring van de exogene hypoxie marker pimonidazole, en we hebben de activatie van het UPR en LAMP3 in de cellen in de sferoïden geobserveerd, maar niet in (normoxische) monolaag cellen. Bovendien, de kankercellen afkomstig van disaggregeerde sferoïden migreerden sneller vergeleken met cellen die in monolagen groeiden. Om te onderzoeken of LAMP3 ook invloed heeft op cel invasie hebben we sferoïden van stabiele LAMP3 knockdown cellen gegenereerd en hun vermogen getest tot infiltratie van collageen matrices, het meest voorkomende eiwit in de extracellulaire matrix. Knockdown van LAMP3 had geen effect op de groei van de sferoïden, maar het had wel aanzienlijk de collageen infiltratie vertraagd. We hebben ook gemengde sferoïden gegenereerd door LAMP3 knockdown en controle cellen te combineren, elk gelabeld met een ander fluorescente kleur, en hun collageen infiltratie gevolgd. In overeenstemming met onze eerdere resultaten hadden de LAMP3 knockdown cellen in de gemengde sferoïden een verminderde capaciteit tot collageen infiltratie vergeleken met de controle cellen. Samenvattend, onze resultaten vanuit de studie beschreven in Hoofdstuk 4 suggereren dat zowel het UPR als LAMP3 cel migratie en invasie bevorderen tijdens hypoxie.

In Hoofdstuk 5 hebben we direct de bijdrage van de hypoxische activering van het UPR en LAMP3 tot metastasering getest door middel van een diermodel van hypoxie-geïnduceerde metastatische cervixkanker. In dit model vindt spontane metastasering plaats van de primaire tumoren die gegenereerd worden van de humane ME180 cervixkanker cellijn in de cervix van muizen, naar de regionale lymfeklieren in het bekken (9). Eerder onderzoek met dit model heeft aangetoond dat wanneer de muizen die deze tumoren dragen worden blootgesteld aan cyclische hypoxie, de metastasering naar de lymfeklieren toeneemt (4), waardoor dit model erg geschikt is om de moleculaire mechanismes van hypoxie-gereguleerde metastasering te bestuderen. We hebben een isogene ME180 sub cellijn gegenereerd waarin doxycycline-geïnduceerde verstoring van UPR signaaloverdracht via de PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4-tak plaats kan vinden. Het gebruik van een induceerbaar model heeft ons in staat gesteld om een mogelijk betrokkenheid van het UPR in metastasering los te koppelen van zijn welbekende rol in primaire tumorvorming (10). We hebben ontdekt dat verstoring van UPR-gemedieerde signaaloverdracht in bestaande tumoren resulteert in een complete inhibitie van hypoxie-gereguleerde lymfeklieren metastasering. Wat nog belangrijker is, is dat inhibitie van UPR-gemedieerde signaaloverdracht aanzienlijk uitzaaiing naar de lymfeklieren verminderde, zelfs in dieren die niet waren blootgesteld aan de additionele *in vivo* hypoxie behandeling.

Vervolgens hebben we de verschillende mechanismes onderzocht door middel van welke signaaloverdracht via het UPR bijdraagt aan hypoxie-gereguleerde metastasering. Eerdere onderzoeken hebben aangetoond dat het UPR een belangrijke bijdrage levert aan hypoxie tolerantie en tumorgroei doordat het verscheidene cellulaire processen beïnvloedt zoals autofagie, angiogenese, pH regulatie en de eliminatie van reactieve zuurstofverbindingen (ROS, reactive oxygen species) (10-15). We hebben ontdekt dat UPR deficiënte ME180 cellen gevoeliger zijn voor hypoxie-geïnduceerde celdood *in vitro* en verstoring van UPR signaaltransductie belemmerde ook de tumorgroei *in vivo*. Echter, tolerantie mechanismen alleen kunnen niet de bijdrage van PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 tot hypoxie-gereguleerde metastasering verklaren in ons model. In plaats daarvan wijzen onze resultaten erop dat LAMP3 een fundamentele bijdrage levert aan hypoxie-gereguleerde lymfeklieren metastasering volgend op UPR activatie. Het uitschakelen van LAMP3 expressie verhinderde aanzienlijk hypoxie-gestuurde uitzaaiing naar de lymfeklieren, maar had geen effect op hypoxie tolerantie or tumorgroei. In overeenstemming met onze studie beschreven in Hoofdstuk 4, hebben we in plaats daarvan bewijs gevonden voor een rol van LAMP3 in hypoxie-gereguleerde cel migratie in dit model.

We hebben vervolgens onderzocht of de relatie tussen hypoxie en LAMP3 ook bestaat in humane cervix tumoren, een van de kankersoorten waarin een directe associatie tussen tumor hypoxie en metastasering is gevonden (1, 16)(Hoofdstuk 5). LAMP3 expressie werd bepaald in een set van cervixkanker biopoten verkregen uit klinische studies in de Princess Margaret Cancer Centre, Toronto, waarin de mate van tumor hypoxie voorafgaande aan de behandeling is gemeten met behulp van zuurstof naald elektrodes. Echter, omdat cervixkanker een van de kankersoorten is waarin amplificatie van het LAMP3 gen is gevonden (17), hebben we eerst het aantal kopieën van het LAMP3 gen bepaald met behulp van een FISH analyse. Hierdoor waren we in staat om onderscheid te maken tussen hypoxie-gereguleerde LAMP3 expressie en verhoogde LAMP3 expressie als gevolg van genetische amplificatie. Overeenkomstig met eerdere cervixkanker studies, hebben we in 38% van alle patiënten een verhoogd aantal kopieën van het LAMP3 gen geobserveerd. Wat nog belangrijker is, is dat er in patiënten met een normaal aantal LAMP3 kopieën een positieve en statistisch significante associatie tussen hypoxie (HP5) en LAMP3 expressie aanwezig was, terwijl er niet zo een correlatie werd gevonden in de patiënten die een amplificatie van het LAMP3 gen hebben. Deze resultaten duiden erop dat LAMP3 expressie in cervixkanker abnormaal is door zowel een genetisch mechanisme (amplificatie) als ook hypoxie (UPR-gemedieerde inductie), en suggereren dat de slechte prognose van patiënten met hypoxische cervix tumoren mede wordt veroorzaakt door PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 activatie van LAMP3 en verhoogde capaciteit tot metastasering.

We hebben ons LAMP3 expressie analyse beschreven in Hoofdstuk 5 uitgebreid naar borstkanker patiënten (Hoofdstuk 6). We hebben ontdekt dat LAMP3 mRNA expressie verhoogd is in steroid hormoon receptor-negatieve borsttumoren en in tumoren afkomstig van lymfeklier-positieve patiënten, wat suggereert dat LAMP3 expressie geassocieerd is met agressievere tumoren. Bovendien hebben we laten zien dat LAMP3 een afhankelijke negatieve prognostische factor is voor locoregionale controle in patiënten die een borstsparende operatie (lumpectomie) en radiotherapie hebben ondergaan. Aangezien hypoxie ook prognostisch is voor lokale controle in radiotherapie-behandelde hoofd- en halstumoren (18, 19), suggereren onze bevindingen dat LAMP3 ook een potentiële endogene marker is voor hypoxie-geïnduceerde radioresistentie in borstkanker.

## References

1. Fyles A, Milosevic M, Hedley D, Pintilie M, Levin W, Manchul L, et al. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20:680-7.
2. Milosevic M, Warde P, Menard C, Chung P, Toi A, Ishkanian A, et al. Tumor hypoxia predicts biochemical failure following radiotherapy for clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:2108-14.
3. Sundfor K, Lyng H, Rofstad EK. Tumour hypoxia and vascular density as predictors of metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *British journal of cancer.* 1998;78:822-7.
4. Cairns RA, Hill RP. Acute hypoxia enhances spontaneous lymph node metastasis in an orthotopic murine model of human cervical carcinoma. *Cancer research.* 2004;64:2054-61.
5. Cairns RA, Kalliomaki T, Hill RP. Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer research.* 2001;61:8903-8.
6. Rofstad EK, Gaustad JV, Egeland TA, Mathiesen B, Galappathi K. Tumors exposed to acute cyclic hypoxic stress show enhanced angiogenesis, perfusion and metastatic dissemination. *International journal of cancer.* 2010;127:1535-46.
7. Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1988;85:9533-7.
8. Kanao H, Enomoto T, Kimura T, Fujita M, Nakashima R, Ueda Y, et al. Overexpression of LAMP3/TSC403/DC-LAMP promotes metastasis in uterine cervical cancer. *Cancer research.* 2005;65:8640-5.
9. Cairns RA, Hill RP. A fluorescent orthotopic model of metastatic cervical carcinoma. *Clinical & experimental metastasis.* 2004;21:275-81.
10. Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, Fels D, Blais J, Hu N, et al. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *The EMBO journal.* 2005;24:3470-81.

11. Blais JD, Addison CL, Edge R, Falls T, Zhao H, Wary K, et al. Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. *Molecular and cellular biology*. 2006;26:9517-32.
12. Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, Hammond E, Lee AH, Yoshida H, et al. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer research*. 2004;64:5943-7.
13. Rouschop KM, Dubois LJ, Keulers TG, van den Beucken T, Lambin P, Bussink J, et al. PERK/eIF2alpha signaling protects therapy resistant hypoxic cells through induction of glutathione synthesis and protection against ROS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:4622-7.
14. Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest*. 2010;120:127-41.
15. van den Beucken T, Ramaekers CH, Rouschop K, Koritzinsky M, Wouters BG. Deficient carbonic anhydrase 9 expression in UPR-impaired cells is associated with reduced survival in an acidic microenvironment. *Radiother Oncol*. 2009;92:437-42.
16. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer research*. 1996;56:4509-15.
17. Wangsa D, Heselmeyer-Haddad K, Ried P, Eriksson E, Schaffer AA, Morrison LE, et al. Fluorescence in situ hybridization markers for prediction of cervical lymph node metastases. *Am J Pathol*. 2009;175:2637-45.
18. Nordsmark M, Overgaard J. A confirmatory prognostic study on oxygenation status and loco-regional control in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiation therapy. *Radiother Oncol*. 2000;57:39-43.
19. Nordsmark M, Overgaard J. Tumor hypoxia is independent of hemoglobin and prognostic for loco-regional tumor control after primary radiotherapy in advanced head and neck cancer. *Acta Oncol*. 2004;43:396-403.