

University of Groningen

Strategies and mechanisms for enhancing receptor-specific TRAIL-induced apoptosis

Zhou, Xinyu

DOI:
[10.33612/diss.219092022](https://doi.org/10.33612/diss.219092022)

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:
2022

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

Citation for published version (APA):
Zhou, X. (2022). *Strategies and mechanisms for enhancing receptor-specific TRAIL-induced apoptosis*. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.219092022>

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.

An aerial photograph of a dense forest, showing a complex pattern of tree crowns. The image is overlaid with a vertical gradient that transitions from a dark blue at the top to a deep purple at the bottom. The text 'CHAPTER 7' is centered horizontally and rendered in a large, bold, serif font. The letters are filled with a fine, white, grainy texture, giving them a shimmering or crystalline appearance. A soft, dark shadow is cast beneath the text, making it stand out against the background.

CHAPTER 7



Summary and future perspectives

1. Summary

The human race has been dealing with cancer for thousands of years. The earliest evidence of malignant lesions was discovered by Calvin Wells on a skull dating back nearly 5,000 years [1]. However, the diagnosis and treatment of cancer have only been developed in recent centuries. Nowadays, cancer has become one of the main threats to human health. Except for the conventional treatment, such as surgery, radiotherapy, and chemotherapy, novel therapeutics with fewer side effects have been established. Targeted therapy is aiming to block the growth or the metastasis of cancer cells by targeting specific proteins or genes [2]. It includes hormone therapies, signal transduction inhibitors, gene expression modulators, apoptosis inducers, angiogenesis inhibitors, immunotherapies, and toxin delivery molecules [3]. To avoid the development of cancer cell resistance to a certain therapy, the combination treatment is usually applied to patients. Among all the mentioned therapeutics, in this thesis, we mainly focus on the apoptosis inducer and its combination treatment.

When it comes to apoptosis inducers, tumor necrosis factor (TNF) superfamily members exhibit an indispensable influence on tumor cell apoptosis. In particular, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) shows its specificity to cancer cells and has been widely studied over the past few decades [4,5]. TRAIL induces cancer cell death by binding with death receptors. To investigate the contribution of DR4 and DR5 to TRAIL-induced apoptosis, the receptor-specific TRAIL variants were utilized in this thesis. Besides, TRAIL resistance in some cancer cells limits its clinical application [6,7]. Therefore, in this thesis, we aim to use the combination treatment to enhance TRAIL effectiveness, uncover its underlying mechanism, and try to study TRAIL resistance in tumor spheroids.

In all the identified TNF superfamily ligands, TRAIL is among one of the nine ligands that harbor more than one receptor. By binding with different receptors, the ligands transduce dissimilar signaling pathways or are neutralized by decoy receptors. To reveal the function of the receptors and enhance the efficacy of the ligands, variants and antibodies were made to target the monoreceptor. In **Chapter 2**, we introduced the function and signaling pathways of six promiscuous TNF family ligands, namely Tumor necrosis factor (TNF- α), lymphotoxin (LT), TRAIL, receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), FasL, and LIGHT. Then, we summarized the published protein engineering results and the performance of the mentioned ligands, including corresponding variants, fusion proteins, and antibodies. It turns out that engineered proteins can exhibit enhanced efficacy towards specifically intended receptor-mediated pathways and can show fewer side effects due to reduced binding to untargeted receptors. Moreover, the

receptor-specific ligands were utilized as experimental tools for the study of certain pathways. In this review, we also discussed the TRAIL variants we used in this thesis, which is the foundation of the whole research.

Based on the receptor-specific TRAIL variants, we explored the way to enhance their effectiveness in cancer cells. As proven anti-malaria drugs, the application and safety of artemisinin (ART)-type drugs has been well established in clinical trials. In the early 1990s, their anti-cancer property has been identified and researched hereafter [8,9]. In **Chapter 3**, we treated colon cancer cells with the combination of ART-type drugs and TRAIL variants. We found that dihydroartemisinin (DHA) and artesunate (ATS) significantly enhance TRAIL-induced apoptosis in HCT116 and DLD-1 cell lines. Moreover, the mRNA level, cell surface amount, and overall protein level of DR5 are significantly increased by ART-type drugs in HCT116 cells, but less in DLD-1 cells. Then, it has been proved that DHA significantly induces the expression of P53 and its downstream targets in HCT116. In the P53 knockdown HCT116 cells, the upregulation of DR5 expression DHA was reduced compared with control cells. Meanwhile, the knockdown of P53 rescued HCT116 cells from the combination of DHA and DHER-induced cell death. Altogether, we demonstrated that ART-type drugs sensitize DHER-induced apoptosis through P53 regulated DR5 expression mainly in P53 wild type (WT) HCT116 cell line, but less in P53 mutated DLD-1 cell line (Figure 1). Last but not least, the combination of DHA and TRAIL significantly reduces cell viability in tumor spheroids, indicating its potential as a therapy for cancer patients.

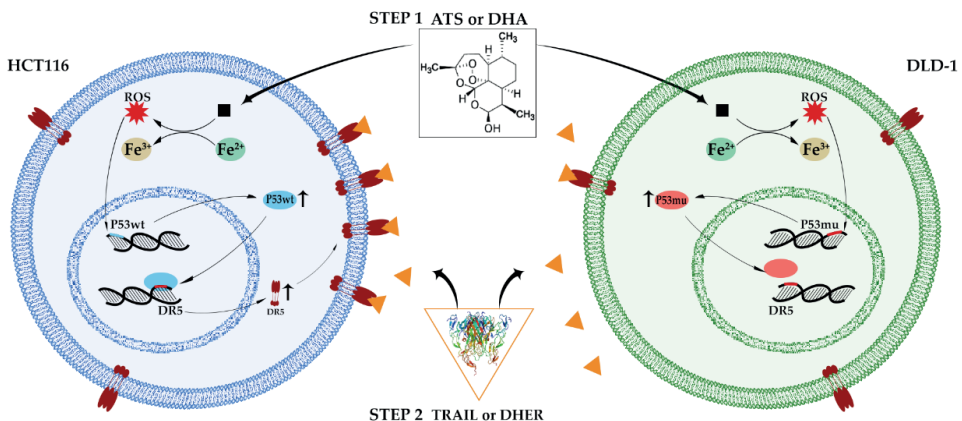


Figure 1. Schematic illustration of the effects of ATS/DHA on DR5 expression via P53 in HCT116 and DLD-1 cells.

However, TP53 is the most frequently mutated gene in cancer cells [10], limiting

the application of the treatment mentioned above. Therefore, we tried to figure out the possibility of using ART-type drugs to enhance TRAIL-induced apoptosis in P53 mutated cancer cells, such as triple-negative breast cancer (TNBC) cell lines. As mentioned in Chapter 3, the effects of combining DHA and TRAIL on DLD-1 cells are relatively weak as compared to HCT116 cells. In **Chapter 4**, we firstly introduced holo-transferrin (TF) to DHA to form DHA-TF adducts, which generated reactive oxygen species (ROS) and induced cell death in the tested TNBC cell lines. It is verified that DHA-TF adducts resulted in both apoptosis and ferroptosis. Subsequently, DR5 expression was significantly more increased by DHA-TF as compared to DHA individual treatment. Consequently, DHA-TF significantly enhances DHER-induced apoptosis in P53 mutated TNBC cell lines. This cell death can be rescued by caspase inhibitor and ROS inhibitors confirming the activation of apoptosis. However, apart from P53, the underlying mechanism between ROS and DR5 still needs further investigation.

To comprehend and summarize the influence of ART-type drugs on cancer cell death, a literature review was performed in **Chapter 5** (Figure 2). Except for apoptosis and ferroptosis, we observed in our research, ART-type drugs also induce other regulated cell death (RCD) mechanisms, such as autophagy, necroptosis, and pyroptosis. Hence, we first recapped the signaling pathways of the mentioned RCD. Then, we collected the published data in the recent ten years and summarized the effects of ART-type drugs on molecules within each pathway. The combination of ART-type drugs with RCD-related proteins or antibodies has been discussed. Moreover, based on the mechanism of action and the effects on certain proteins, this review also provides potential choices for combination therapy for future research, such as ART-type drugs combined with FAS receptor or recombinant human arginase (rhArg). Besides, precision delivery is important for cancer treatment. Therefore, the categories, materials, and effectiveness of nanocarrier-loaded ART-type drugs have been listed to give a comprehensive overview of all the options for future application.

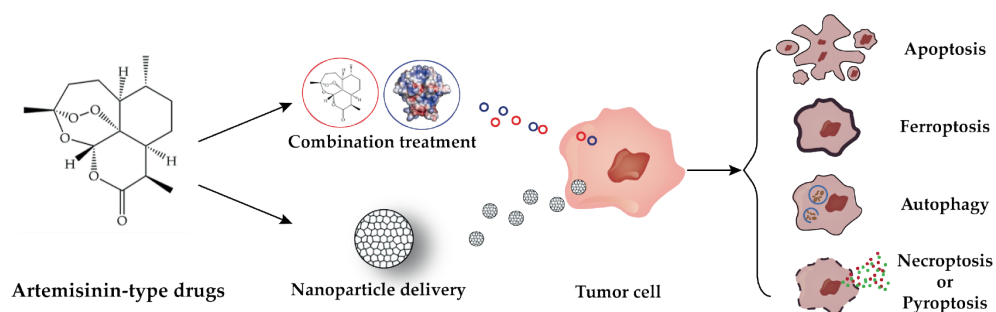


Figure 2. Using combination treatment or nanoparticle delivery to enhance Artemisinin-type drugs induced apoptosis, ferroptosis, autophagy, necroptosis, or pyroptosis in tumor cells.

In the above research, we found that ART-type drugs mainly induce the expression of DR5 in diverse cancer cell lines. We became curious about the difference between DR4 and DR5 in tumor cells. Meanwhile, it has been shown that cell becomes more resistant to TRAIL-induced apoptosis when they form spheroids. Taken together, we analyzed the expression pattern of DR4 and DR5 in 2D and 3D systems of multiple cancer cell lines in **Chapter 6**. When compared with corresponding 2D cells, tumor spheroids express significantly fewer death receptors, which explains the observed TRAIL resistance in spheroids. Interestingly, we found that ionizing radiation also induces the expression of DR5 but not DR4, making irradiated tumor cells more sensitive to DHER-induced apoptosis, but more resistant to 4C7. The finding suggests that the combination of radiotherapy with the DR4-specific TRAIL variant may even reverse their efficacy, indicating the possible reason for the failure of the combination of radiotherapy with TRAIL in clinical trials.

2. Future perspectives

In this thesis, we first focused on the combination treatment of ART-type drugs and receptor-specific TRAIL variants in diverse cancer cell lines. In Chapter 2, we found that DHA enhances DHER-induced apoptosis via P53 WT regulated DR5 upregulation. However, we then showed that DHA-TF adducts also increase DR5 expression and stimulate DHER-induced apoptosis in a P53-independent manner in TNBC cells. The results from the two chapters indicate that the DR5 upregulation is related to another signal transduction apart for the P53 pathway. By doing additional experiments, we found that the c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor SP600125 rather than rescue cancer cells from the combination treatment, continues to enhance the effectiveness. The results are opposite to the common knowledge that JNK is the activator of death signaling and the suppressor of cell survival [11,12]. It is, therefore, necessary to conduct more experiments and investigations before making any conclusions. Except for the JNK inhibitor, we also analyzed the influence of epigenetic regulators on the combination treatment. It turns out that the inhibitors of DNA methyltransferase (DNMT) and histone deacetylases (HDAC) are unable to rescue tumor cells from the combination of DHA-TF with DHER, but the enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitor DZNep significantly reverses cell death and reduces the upregulated DR5 expression via DHA-TF.

Besides, it has been reported that the transcription factor CCAAT/enhancer-binding

protein homologous protein (CHOP) is responsible for DR5 upregulation under endoplasmic reticulum (ER) stress [13,14]. Meanwhile, ART-type drugs have been proved to induce the expression of CHOP in diverse cancer cell lines [15–17]. So, it is interesting to investigate the potential relationship between ART-type drugs, CHOP, and DR5. Meanwhile, a multi-protein interaction network of DR4, DR5, and the potential proteins has been made (Figure 3). We hope it can provide more ideas of the possible explanations for DR5 upregulation.

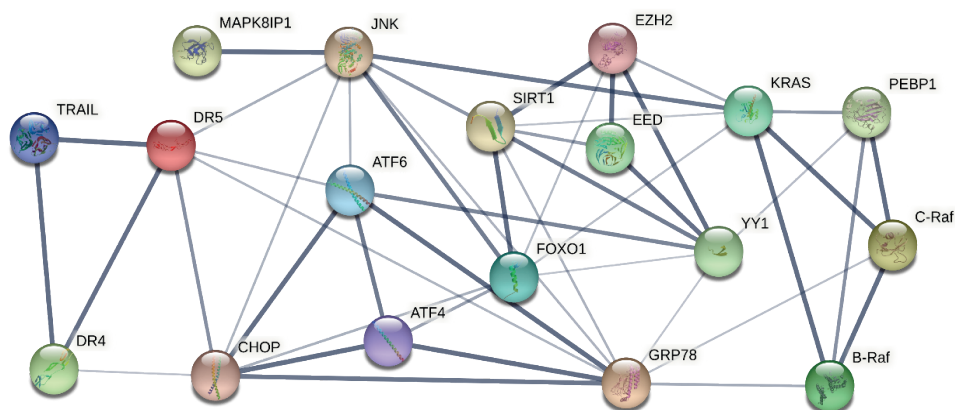


Figure 3. Protein association networks of DR4, DR5, and the related proteins analyzed by STRING. The edges indicate both functional and physical protein associations. The line thickness indicates the strength of data support. The active interactions are based on text mining, experiments, and databases from a variety of sources (sources can be found on string-db.org/).

In chapter 6, we investigated the cell surface expression of death receptors in 2D cells and 3D spheroids with/without radiation. We found it is appealing that radiation induces DR5 expression but decreases DR4 expression in tumor spheroids, correspondingly enhancing DHER-induced cell death but suppressing 4C7 effectiveness. The contrary effects of radiotherapy on DR4 and DR5 indicate the non-identical regulating mechanism between death receptors. First, the unique GXXXG motif in DR5 makes its homodimerization more stable for signaling transduction [18]. Then, Elias et al. demonstrated that the frequent methylation of DR4 promotor contributes to TRAIL resistance in glioma cells [19]. Nevertheless, Venza et al. showed that the expression of DR4 and DR5 is independent of the promoter methylation in malignant melanoma [20]. The different cell types could be responsible for the distinct outcomes. Besides, DR4 but not DR5 has been identified as the substrate of membrane-associated RING-CH (MARCH)-8 ubiquitin ligase, which reduces the cell surface amount of DR4 [21]. Our group also

observed the presence of DR5 but no DR4 on extracellular vesicles of COLO205 cells, indicating a dissimilar trafficking and recycling process of DR4. Altogether, DR4 and DR5 harbor different gene sequences, epigenetic modifications, post-translational modification, and trafficking routes, making DR5 more sensitive to stress. More research is needed to draw any further conclusions.

Reference

1. Wells, C. Ancient Egyptian Pathology. *J. Laryngol. Otol.* **1963**, *77*, 261–265.
2. Lee, Y.T.; Tan, Y.J.; Oon, C.E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *834*, 188–196.
3. Yang, H. Targeted nanosystems: Advances in targeted dendrimers for cancer therapy. *Nanomedicine* **2016**, *12*, 309–16.
4. Kretz, A.L.; Trauzold, A.; Hillenbrand, A.; Knippschild, U.; Henne-Bruns, D.; von Karstedt, S.; Lemke, J. Trailblazing strategies for cancer treatment. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*, 456.
5. Wainberg, Z.A.; Messersmith, W.A.; Peddi, P.F.; Kapp, A. V.; Ashkenazi, A.; Royer-Joo, S.; Portera, C.C.; Kozloff, M.F. A phase 1B study of dulanermin in combination with modified FOLFOX6 plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **2013**, *12*, 248–254.
6. Huang, Y.; Yang, X.; Xu, T.; Kong, Q.; Zhang, Y.; Shen, Y.; Wei, Y.; Wang, G.; Chang, K.J. Overcoming resistance to TRAIL-induced apoptosis in solid tumor cells by simultaneously targeting death receptors, c-FLIP and IAPs. *Int. J. Oncol.* **2016**, *49*, 153–163.
7. Deng, D.; Shah, K. TRAIL of Hope Meeting Resistance in Cancer. *Trends in Cancer* **2020**, *6*, 989–1001.
8. Sun, W.C.; Han, J.X.; Yang, W.Y.; Deng, D.A.; Yue, X.F. Antitumor activities of 4 derivatives of artemisic acid and artemisinin B in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* **1992**, *13*, 541–543.
9. Moore, J.C.; Lai, H.; Li, J.R.; Ren, R.L.; McDougall, J.A.; Singh, N.P.; Chou, C.K. Oral administration of dihydroartemisinin and ferrous sulfate retarded implanted fibrosarcoma growth in the rat. *Cancer Lett.* **1995**, *98*, 83–87.
10. Kim, J.Y.; Lee, E.; Park, K.; Park, W.Y.; Jung, H.H.; Ahn, J.S.; Im, Y.H.; Park, Y.H. Clinical implications of genomic profiles in metastatic breast cancer with a focus on TP53 and PIK3CA, the most frequently mutated genes. *Oncotarget* **2017**, *8*, 27997.
11. Shen, H.M.; Liu, Z.G. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 928–939.
12. Dhanasekaran, D.N.; Reddy, E.P. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes Cancer* **2017**, *8*, 682–694.
13. Tian, X.; Ye, J.; Alonso-Basanta, M.; Hahn, S.M.; Koumenis, C.; Dorsey, J.F. Modulation of CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP)-dependent DR5 expression by nelfinavir sensitizes glioblastoma multiforme cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 29408–29416.
14. Kim, I.Y.; Kang, Y.J.; Yoon, M.J.; Kim, E.H.; Kim, S.U.; Kwon, T.K.; Kim, I.A.; Choi, K.S. Amiodarone sensitizes human glioma cells but not astrocytes to TRAIL-induced apoptosis via CHOP-mediated DR5 upregulation. *Neuro. Oncol.* **2011**, *13*, 267–79.
15. Chen, K.; Hua, H.; Zhu, Z.; Wu, T.; Jia, Z.; Liu, Q. Artemisinin and dihydroartemisinin promote β -cell apoptosis induced by palmitate via enhancing ER stress. *Apoptosis* **2020**, *25*, 192–204.

16. Lu, J.J.; Chen, S.M.; Zhang, X.W.; Ding, J.; Meng, L.H. The anti-cancer activity of dihydroartemisinin is associated with induction of iron-dependent endoplasmic reticulum stress in colorectal carcinoma HCT116 cells. *Invest. New Drugs* **2011**, *29*, 1276–1283.
17. Zhang, G.; Li, N.; Tong, Y.; Li, P.; Han, H.; Song, Q.; Yang, B.; Cui, L. Artemisinin derivatives inhibit adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes through upregulation of CHOP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *557*, 309–315.
18. Van Roosmalen, I.A.M.; Quax, W.J.; Kruyt, F.A.E. Two death-inducing human TRAIL receptors to target in cancer: Similar or distinct regulation and function? *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *91*, 447–456.
19. Elias, A.; Siegelin, M.D.; Steinmüller, A.; Von Deimling, A.; Lass, U.; Korn, B.; Mueller, W. Epigenetic silencing of death receptor 4 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in gliomas. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5457–5465.
20. Venza, M.; Visalli, M.; Catalano, T.; Fortunato, C.; Oteri, R.; Teti, D.; Venza, I. Impact of DNA methyltransferases on the epigenetic regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in malignant melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441*, 743–750.
21. Van De Kooij, B.; Verbrugge, I.; De Vries, E.; Gijzen, M.; Montserrat, V.; Maas, C.; Neeffjes, J.; Borst, J. Ubiquitination by the Membrane-associated RING-CH-8 (MARCH-8) Ligase Controls Steady-state Cell Surface Expression of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) Receptor 1*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 6617–6628.

Samenvatting en toekomstperspectieven

1. Samenvatting

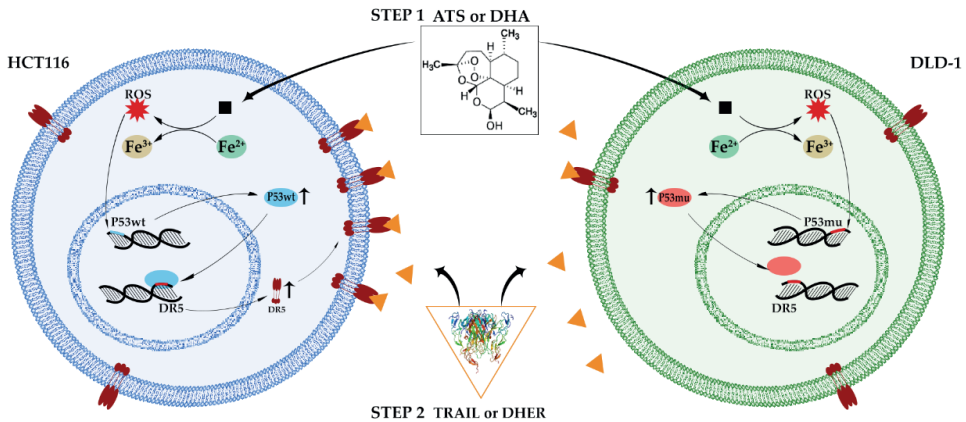
Al duizenden jaren wordt de mens geteisterd door kanker. Het vroegste bewijs van maligne laesies werd bijna 5,000 jaar geleden ontdekt op een menselijke schedel door Calvin Wells [1]. Echter zijn de diagnose en behandeling van kanker pas in de afgelopen eeuwen verder ontwikkeld. Tegenwoordig is kanker één van de voornaamste bedreigingen voor de menselijke gezondheid. Naast de gebruikelijke behandelingen van kanker, zoals operaties, bestraling en chemotherapie, zijn er ook behandelingen ontwikkeld die minder bijwerkingen veroorzaken. Deze gerichte behandeling berust zich hoofdzakelijk op het verhinderen van de snelle groei of metastasering van de kankercellen, door zich te richten op specifieke eiwitten of genen [2]. Deze behandeling bestaat uit hormoontherapie, signaaltransductietherapie, genexpressie modulatoren, apoptose inductoren, angiogenese inhibitoren, immunotherapie en toxine leverende moleculen [3]. Om te voorkomen dat kankercellen resistent worden tegen een bepaalde behandeling, wordt een combinatie van bovengenoemde therapieën vaak toegepast om patiënten te behandelen. In dit proefschrift wordt van alle eerdergenoemde therapieën met name gericht gekeken naar apoptose inductoren, al dan niet in combinatie met andere behandelingen.

Leden van de tumornecrosefactor (TNF) superfamilie spelen een onmisbaar grote rol in de apoptose van kankercellen. Met name TNF-gerelateerde apoptose-inducerend ligand (TRAIL) toont een specificiteit voor kankercellen en is derhalve de afgelopen jaren op grote schaal bestudeerd [4,5]. TRAIL leidt tot apoptose in kankercellen door het binden aan zogenoemde 'dood-receptoren' (DR). Om de bijdrage van DR4 en DR5 aan door TRAIL-geïnduceerde apoptose te onderzoeken, zijn in dit proefschrift receptor-specifieke varianten van TRAIL gebruikt. Bovendien demonstreren enkele kankercellen TRAIL-specifieke resistentie, wat de klinische toepassing van TRAIL belemmert [6,7]. In dit proefschrift wordt daarom bestudeerd of het mogelijk is om met combinatietherapie TRAIL-efficiëntie te verbeteren, het onderliggende mechanisme van TRAIL bloot te leggen en wordt er gekeken naar TRAIL-resistentie in tumor sferoiden.

Van alle geïdentificeerde TNF-superfamilie liganden, is TRAIL één van de negen liganden die meerdere receptoren bevat. Door het binden van deze receptoren, kunnen de liganden verschillende signaalroutes activeren of worden de liganden geneutraliseerd door zogenaamde 'lokaas receptoren'. Om te achterhalen wat de functie van de receptoren is en om de doeltreffendheid van de liganden te

optimaliseren, zijn er varianten en antilichamen ontwikkeld die zich specifiek richten op de mono-receptor. In **Hoofdstuk 2** zijn de functie en signaalroutes van zes verschillende TNF-familie liganden geïntroduceerd, namelijk tumornecrosefactor α (TNF- α), lymfotoxine (LT), TRAIL, receptor activator van NF- κ B ligand (RANKL), FasL en LIGHT. Vervolgens zijn de resultaten van de eerder gepubliceerde ontworpen eiwitten, alsmede het prestatievermogen van de eerdergenoemde liganden, samengevat. Dit omvatte gelijksoortige varianten, fusie-eiwitten en antilichamen. Het is gebleken dat de ontworpen eiwitten geoptimaliseerde functionaliteit vertonen jegens hiervoor speciaal bedoelde receptor-afhankelijke routes en minder bijwerkingen veroorzaken door een verminderde binding aan ongerichte receptoren. Bovendien werden de receptor-specifieke liganden benut als experimentele middelen om bepaalde signaalroutes te bestuderen. In dit reviewartikel zijn ook de varianten van TRAIL uitgelicht, die het fundament vormen van dit proefschrift.

Met de receptor-specifieke varianten van TRAIL in het achterhoofd hebben we onderzocht hoe we de efficiëntie van deze liganden om kankercellen te behandelen konden optimaliseren. Aangezien anti-malaria geneesmiddelen al bewezen en goedgekeurd zijn, is de toepassing en veiligheid van artemisinine (ART)-achtige geneesmiddelen al duidelijk vastgesteld. De anti-kankereigenschappen van deze geneesmiddelengroep is in de vroege jaren 90 van de vorige eeuw ontdekt en zijn sindsdien breed onderzocht [8,9]. In **Hoofdstuk 3** is te lezen hoe we colonkankercellen hebben behandeld met een combinatie van ART-derivaten en de specifieke TRAIL-varianten. We ontdekten dat dihydroartemisinine (DHA) en artesunaat (ATS) de door TRAIL-geïnduceerde apoptose significant verbeterden in cellijnen HCT116 en DLD-1. Bovendien zijn van receptor DR5 de expressie van het mRNA, de hoeveelheid receptoren op het celoppervlak en de algehele hoeveelheid eiwit significant verhoogd door ART-derivaten in HCT116 cellen, maar dit effect is minder in DLD-1 cellen. Daarnaast is bewezen dat DHA de expressie van P53 en de door P53 gereguleerde doelwitten significant induceert in cellijn HCT116. In de HCT116 cellen die geen eiwitten voor P53 bevatten, was de opregulatie van DR5 expressie verminderd ten opzichte van de controlecellen. Daarentegen ondergingen de HCT116 cellen met P53 knockdown geen DHA en DHER-geïnduceerde apoptose. Samengevat is gedemonstreerd dat ART-derivaten wild type (WT) HCT116 cellen sensibiliseren tot DHER-geïnduceerde apoptose via een P53-gereguleerde expressie van DR5, en dat dit in mindere mate het geval is in P53-gemuteerde DLD-1 cellen (Figuur 1). Tenslotte is geconstateerd dat de combinatie van DHA en TRAIL de levensvatbaarheid van cellen in een tumorsferoïde significant reduceert, wat wijst op de potentie van deze combinatie als mogelijke behandeling van kankerpatiënten.

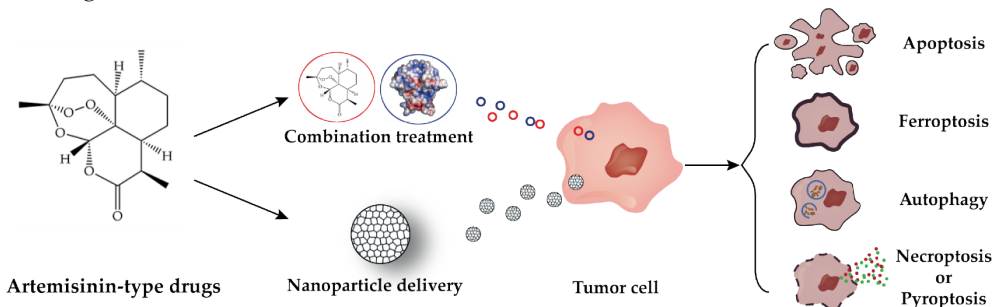


Figuur 1. Schematische illustratie van de effecten van ATS/DHA op DR5 expressie via P53 in HCT116 en DLD-1 cellijnen.

Echter is TP53 het frequentst gemuteerde gen in kankercellen [10], wat de toepassing van bovengenoemde behandeling limiteert. Daarom is onderzocht wat de mogelijkheid is om ART-derivaten te gebruiken om TRAIL-geïnduceerde apoptose te induceren in P53-gemuteerde kankercellen, zoals drievoudig negatieve borstkankercellen (TNBC) cellijnen. Zoals in Hoofdstuk 3 benoemd is, was het effect van DHA en TRAIL in DLD-1 cellen relatief zwak vergeleken met HCT116 cellen. In **Hoofdstuk 4** werd holo-transferrin (TF) geïntroduceerd in combinatie met DHA om zo DHA-TF adducten te vormen. Deze combinatie zorgde voor reactieve zuurstofsoorten (ROS) en induceerde apoptose in TNBC-celijnen. Het is bekend dat DHA-TF adducten zowel apoptose als ferroptose veroorzaken. Daarnaast was de expressie van DR5 significant hoger in cellen behandeld met DHA-TF dan in de cellen die alleen met DHA behandeld zijn. Zodoende kan gezegd worden dat DHA-TF de DHER-geïnduceerde apoptose in P53-gemuteerde TNBC-celijnen significant verhoogt. Deze vorm van celdood kan ongedaan gemaakt worden door caspase inhibitoren en ROS inhibitoren, wat de activatie van apoptose bevestigt. Echter is, naast P53, het onderliggende mechanisme tussen ROS en DR5 nog wel aan vervolgonderzoek onderhevig.

Om de invloed van ART-derivaten op kankerceldood te omvatten en te resumeren, is er in **Hoofdstuk 5** een literatuurstudie uitgevoerd (Figuur 2). Naast apoptose en ferroptose hebben we tijdens dit onderzoek ook geobserveerd dat ART-derivaten andere mechanismen van gereguleerde celdood (RCD) induceren, zoals autofagie, necroptose and pyroptose. Om deze reden is de signaalroute van RCD eerst samengevat. Vervolgens is gepubliceerde data van de afgelopen tien jaar verzameld en is de werking van ART-derivaten op moleculen van elke signaalroute beknopt

opgeschreven. De combinatie van ART-derivaten en RCD-gerelateerde eiwitten en antilichamen zijn aan bod gekomen. Bovendien heeft dit artikel ook potentiële keuzes voor combinatiebehandelingen verschaft voor verder onderzoek, gebaseerd op het actiemechanisme en de effecten van bepaalde eiwitten. Een voorbeeld hiervan is de combinatie van ART-derivaten met FAS-receptor of recombinant humaan arginase (rhArg). Daarnaast is het voor kankerbehandelingen van uiterst belang dat de werkzame stoffen bij de correcte doelwitten terechtkomen. Daarom zijn de categorieën, materialen en effectiviteit van nanocarrier-geladen ART-derivaten vermeld om een omvangrijk overzicht te geven van alle opties voor vervolgonderzoek.



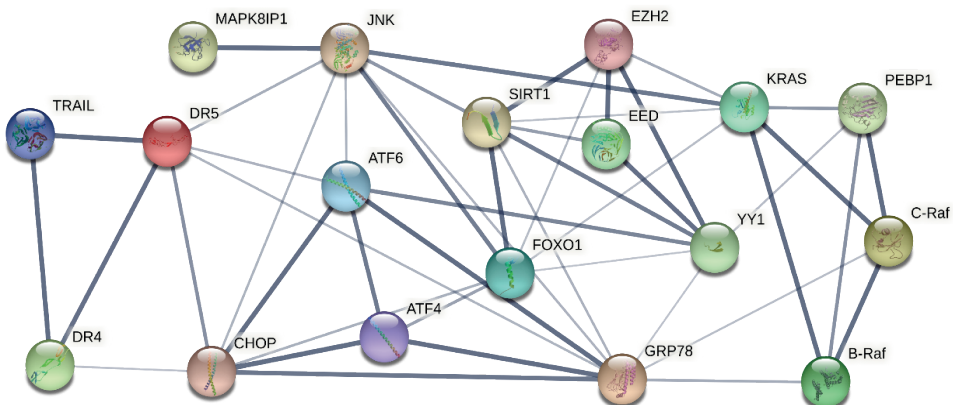
Figuur 2. Door een combinatiebehandeling of nanodeeltjes te leveren aan de tumorcel, kan de werking van Artemisinine-derivaten versterkt worden en zo apoptose, ferroptose, autofagie, necroptose of pyroptose teweegbrengen.

In bovenstaand onderzoek is ontdekt dat ART-derivaten voornamelijk de expressie van DR5 induceren in diverse kankercellijnen. Daarom werd de interesse gewekt om te onderzoeken wat het verschil is tussen DR4 en DR5 in tumorcellen. Inmiddels is bewezen dat cellen resistenter worden tegen TRAIL-geïnduceerde apoptose als ze een tumorsferoïde vormen. In **Hoofdstuk 6** wordt daarom gekeken naar de expressie van DR4 en DR5 in 2D en 3D systemen van verschillende kankercellijnen. In vergelijking met corresponderende 2D cellen, tonen tumorsferoïden significant minder dood-receptoren, wat de geobserveerde resistentie tegen TRAIL verklaart. Dit onderzoek heeft aangetoond dat ioniserende straling de expressie van DR5, maar niet DR4, induceert, wat impliceert dat bestraalde tumorcellen sensitiever zijn voor DHER-geïnduceerde apoptose, maar meer resistent zijn tegen 4C7. Deze resultaten suggereren dat de combinatie van radiotherapie met de DR4-specifieke TRAIL-variant de efficiëntie zelfs ongedaan kan maken, wat de mogelijke reden zou kunnen zijn voor het falen van de combinatiebehandeling van radiotherapie en TRAIL in klinische trials.

2. Toekomstperspectieven

In dit proefschrift is gekeken naar de combinatiebehandeling van ART-derivaten en receptor-specifieke varianten van TRAIL in diverse kankercellijnen. In Hoofdstuk 2 is ontdekt dat DHA de door DHER-geïnduceerde apoptose stimuleert via P53 WT gereguleerde opregulatie van DR5. Echter hebben we ook aangetoond dat DHA-TF adducten de expressie van DR5 doen toenemen en DHER-geïnduceerde apoptose stimuleren in een P53-onafhankelijke manier in TNBC-cellen. Deze resultaten impliceren dat de toename van DR5 verwant is aan een andere signaalroute van P53. Door aanvullend onderzoek te doen, vonden we dat de c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor SP600125 de kankercellen niet redt van de behandeling, maar de effectiviteit juist lijkt te vergroten. Deze resultaten contraderen de algemene kennis dat JNK de activator is van de signaalroutes die leiden tot celdood en de overleving van cellen onderdrukt [11,12]. Het is daarom noodzakelijk dat er aanvullend onderzoek wordt gedaan voordat er conclusies getrokken kunnen worden. Naast de JNK-inhibitor is ook de invloed van epigenetische regulatoren op de combinatiebehandeling geanalyseerd. Hieruit is gebleken dat de inhibitoren van DNA methyltransferase (DNMT) en histon deacetylase (HDAC) niet in staat zijn om tumorcellen te redden van de combinatiebehandeling met DHA-TF en DHER, terwijl de versterker van zeste homolog 2 (EZH2) inhibitor DZNep via DHA-TF celdood significant terugdraait en de expressie van DR5 reduceert.

Daarnaast is gebleken dat de transcriptiefactor CCAAT/enhancer-bindend eiwit homolog 1 (CHOP) verantwoordelijk is voor de opregulatie van DR5 onder stress van het endoplasmatisch reticulum (ER) [13,14]. Inmiddels is bewezen dat ART-derivaten de expressie van CHOP induceren in diverse kankercellijnen [15-17]. Daarom is het interessant om de potentiële relatie tussen ART-derivaten, CHOP en DR5 te onderzoeken. Intussen is er een multi-eiwit interactienetwerk van DR4, DR5 en de potentiële eiwitten gemaakt (Figuur 3). We hopen dat dit meer ideeën geeft voor de mogelijke verklaring van DR5 opregulatie.



Figuur 3. Eiwitassociatienetwerk van DR4, DR5 en de verwante eiwitten geanalyseerd door STRING. De randen geven zowel functionele als fysieke eiwitassociaties aan. De dikte van de lijn wijst op de sterkte van datasupport. De actieve interacties zijn gebaseerd op tekst mining, experimenten en databases van een variëteit aan bronnen (deze bronnen kunnen geraadpleegd worden op string-db.org/).

In Hoofdstuk 6 is de expressie van dood-receptoren op het celoppervlak onderzocht in zowel 2D cellen als 3D sferoiden met en zonder bestraling. Hieruit is gebleken dat bestraling de expressie van DR5 opreguleert, maar de expressie van DR4 in tumorcellen juist vermindert, en daarmee gelijktijdig DHER-geïnduceerde celdood stimuleert maar de effectiviteit van 4C7 onderdrukt. Dit tegenstrijdige effect van radiotherapie op DR4 en DR5 impliceert het niet-identieke reguleringsmechanisme tussen dood-receptoren. Ten eerste maakt het unieke GXXXG-motief van DR5 homodimerisatie stabiel voor signaaltransductie [18]. Ten tweede is door Elias et al. gedemonstreerd dat frequente methylering van de DR4 promotor bijdraagt aan TRAIL-resistentie in glioma cellen [19]. Desondanks demonstreerde Venza et al. dat de expressie van DR4 en DR5 onafhankelijk is van de promoter methylering in maligne melanomen [20]. De verschillende celtypen zouden verantwoordelijk kunnen zijn voor deze afwijkende bevindingen. Daarnaast is DR4, maar niet DR5, geïdentificeerd als het substraat van membraan-geassocieerde RING-CH (MARCH)-8 ubiquitine ligase, wat het aantal DR4-receptoren op het celoppervlak vermindert [21]. Onze groep heeft ook de aanwezigheid van DR5, maar niet van DR4, geobserveerd op extracellulaire blaasjes van COLO205 cellen, wat wijst op een ongelijk transport- en recyclingproces. Samenvattend kan gezegd worden dat DR4 en DR5 verschillende gensequenties, epigenetische modificaties, post-translationele modificaties en transportroutes herbergen, waardoor DR5 gevoeliger is voor stress. Aanvullend onderzoek is noodzakelijk om verdere conclusies te trekken.

Referenties

1. Wells, C. Ancient Egyptian Pathology. *J. Laryngol. Otol.* **1963**, *77*, 261–265.
2. Lee, Y.T.; Tan, Y.J.; Oon, C.E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *834*, 188–196.
3. Yang, H. Targeted nanosystems: Advances in targeted dendrimers for cancer therapy. *Nanomedicine* **2016**, *12*, 309–16.
4. Kretz, A.L.; Trauzold, A.; Hillenbrand, A.; Knippschild, U.; Henne-Bruns, D.; von Karstedt, S.; Lemke, J. Trailblazing strategies for cancer treatment. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*, 456.
5. Wainberg, Z.A.; Messersmith, W.A.; Peddi, P.F.; Kapp, A. V.; Ashkenazi, A.; Royer-Joo, S.; Portera, C.C.; Kozloff, M.F. A phase 1B study of dulanermin in combination with

- modified FOLFOX6 plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **2013**, *12*, 248–254.
6. Huang, Y.; Yang, X.; Xu, T.; Kong, Q.; Zhang, Y.; Shen, Y.; Wei, Y.; Wang, G.; Chang, K.J. Overcoming resistance to TRAIL-induced apoptosis in solid tumor cells by simultaneously targeting death receptors, c-FLIP and IAPs. *Int. J. Oncol.* **2016**, *49*, 153–163.
 7. Deng, D.; Shah, K. TRAIL of Hope Meeting Resistance in Cancer. *Trends in Cancer* **2020**, *6*, 989–1001.
 8. Sun, W.C.; Han, J.X.; Yang, W.Y.; Deng, D.A.; Yue, X.F. Antitumor activities of 4 derivatives of artemisic acid and artemisinin B in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* **1992**, *13*, 541–543.
 9. Moore, J.C.; Lai, H.; Li, J.R.; Ren, R.L.; McDougall, J.A.; Singh, N.P.; Chou, C.K. Oral administration of dihydroartemisinin and ferrous sulfate retarded implanted fibrosarcoma growth in the rat. *Cancer Lett.* **1995**, *98*, 83–87.
 10. Kim, J.Y.; Lee, E.; Park, K.; Park, W.Y.; Jung, H.H.; Ahn, J.S.; Im, Y.H.; Park, Y.H. Clinical implications of genomic profiles in metastatic breast cancer with a focus on TP53 and PIK3CA, the most frequently mutated genes. *Oncotarget* **2017**, *8*, 27997.
 11. Shen, H.M.; Liu, Z.G. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 928–939.
 12. Dhanasekaran, D.N.; Reddy, E.P. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes Cancer* **2017**, *8*, 682–694.
 13. Tian, X.; Ye, J.; Alonso-Basanta, M.; Hahn, S.M.; Koumenis, C.; Dorsey, J.F. Modulation of CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP)-dependent DR5 expression by nelfinavir sensitizes glioblastoma multiforme cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 29408–29416.
 14. Kim, I.Y.; Kang, Y.J.; Yoon, M.J.; Kim, E.H.; Kim, S.U.; Kwon, T.K.; Kim, I.A.; Choi, K.S. Amiodarone sensitizes human glioma cells but not astrocytes to TRAIL-induced apoptosis via CHOP-mediated DR5 upregulation. *Neuro. Oncol.* **2011**, *13*, 267–79.
 15. Chen, K.; Hua, H.; Zhu, Z.; Wu, T.; Jia, Z.; Liu, Q. Artemisinin and dihydroartemisinin promote β -cell apoptosis induced by palmitate via enhancing ER stress. *Apoptosis* **2020**, *25*, 192–204.
 16. Lu, J.J.; Chen, S.M.; Zhang, X.W.; Ding, J.; Meng, L.H. The anti-cancer activity of dihydroartemisinin is associated with induction of iron-dependent endoplasmic reticulum stress in colorectal carcinoma HCT116 cells. *Invest. New Drugs* **2011**, *29*, 1276–1283.
 17. Zhang, G.; Li, N.; Tong, Y.; Li, P.; Han, H.; Song, Q.; Yang, B.; Cui, L. Artemisinin derivatives inhibit adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes through upregulation of CHOP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *557*, 309–315.
 18. Van Roosmalen, I.A.M.; Quax, W.J.; Kruyt, F.A.E. Two death-inducing human TRAIL receptors to target in cancer: Similar or distinct regulation and function? *Biochem.*

Pharmacol. **2014**, *91*, 447–456.

19. Elias, A.; Siegelin, M.D.; Steinmüller, A.; Von Deimling, A.; Lass, U.; Korn, B.; Mueller, W. Epigenetic silencing of death receptor 4 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in gliomas. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5457–5465.
20. Venza, M.; Visalli, M.; Catalano, T.; Fortunato, C.; Oteri, R.; Teti, D.; Venza, I. Impact of DNA methyltransferases on the epigenetic regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in malignant melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441*, 743–750.
21. Van De Kooij, B.; Verbrugge, I.; De Vries, E.; Gijzen, M.; Montserrat, V.; Maas, C.; Neefjes, J.; Borst, J. Ubiquitination by the Membrane-associated RING-CH-8 (MARCH-8) Ligase Controls Steady-state Cell Surface Expression of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) Receptor 1*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 6617–6628.