

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA – ÊNFASE EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

FERNANDA DITTRICH PINTO OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO TRANSCRIPTÔMICA DA RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL
ENVELADAS EM PACIENTES COM GLIOBLASTOMA**

Porto Alegre
2022

Fernanda Dittrich Pinto Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO TRANSCRIPTÔMICA DA RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL
ENVELADAS EM PACIENTES COM GLIOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharela em
Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia
Molecular do Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz

Coorientadora: Luiza Cherobini Pereira

Periódico: Cancer Letters

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Fernanda Dittrich Pinto
CARACTERIZAÇÃO TRANSCRIPTÔMICA DA RESPOSTA A
PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS EM PACIENTES COM GLIOBLASTOMA
/ Fernanda Dittrich Pinto Oliveira. -- 2022.
70 f.
Orientador: Guido Lenz.

Coorientadora: Luiza Cherobini Pereira.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia
Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Glioblastoma. 2. Resposta a proteínas mal
enoveladas. 3. Estresse do retículo endoplasmático. 4.
Transcriptômica. 5. Sequenciamento de RNA. I. Lenz,
Guido, orient. II. Pereira, Luiza Cherobini,
coorient. III. Título.

Fernanda Dittrich Pinto Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO TRANSCRIPTÔMICA DA RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL
ENVELADAS EM PACIENTES COM GLIOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharela em Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia Molecular do
Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovado em: Porto Alegre, (Data).

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Fabrício Figueiró – UFRGS

Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela – UFRGS

Luiza Cherobini Pereira – UFRGS (coorientadora)

Prof. Dr. Guido Lenz - UFRGS (orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por serem minha maior fonte de amor e apoio incondicional, e à minha irmã Paula, pela parceria e pelo carinho todos os dias.

Ao Felipe, porque trilhar esse caminho juntos tornou tudo mais leve.

Ao professor Guido, pela orientação durante os 3 últimos anos e pela confiança em mim e neste trabalho.

À minha coorientadora Luiza, pela ajuda para a execução deste e de outros projetos, pelos conselhos e ensinamentos e pela amizade.

Ao Rafael, pela paciência para me ensinar desde como pipetar até as análises de bioinformática necessárias para este trabalho.

Aos meus colegas do LabSinal, pelo acolhimento e pela ajuda durante esses anos.

Aos meus colegas de turma, por todos os momentos compartilhados nesses 4 anos.

Aos professores do curso que participaram da minha formação até aqui, pela dedicação e pelos aprendizados.

À minha família e aos meus amigos, pelo apoio e pela amizade sempre.

RESUMO

O retículo endoplasmático (RE) é o principal sítio de enovelamento e controle de qualidade de proteínas. A desregulação de processos celulares relacionados ao enovelamento e tráfego de proteínas leva ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, desencadeando o estresse do RE. Para lidar com esse estresse, as células ativam uma cascata de sinalização denominada resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês *unfolded protein response*). A UPR é um processo adaptativo que aumenta a capacidade de enovelamento proteico do RE para restaurar a homeostase e manter a viabilidade e função celular. Contudo, se o estresse for permanente ou intenso, essas vias de sinalização podem induzir morte celular por apoptose. Vários estudos demonstraram um papel relevante da UPR no desenvolvimento e na progressão tumorais, e a modulação da maquinaria de estresse do RE como estratégia anticancerígena já foi relatada. Portanto, visto a necessidade urgente de melhorar o padrão de tratamento de glioblastoma (GBM), um tumor agressivo com sobrevida mediana de 15 a 18 meses, a modulação de componentes específicos da UPR ou a indução de um estresse do RE agudo são estratégias terapêuticas promissoras. O objetivo do trabalho foi caracterizar o perfil transcricional da UPR em pacientes com GBM por meio da exploração de dados de expressão gênica populacionais e de *single-cell*. Nossas análises mostram que a expressão de genes relacionados ao estresse do RE apresenta alta heterogeneidade intra e intertumoral. Além disso, encontramos a UPR regulada positivamente em GBM e identificamos novos fatores de risco e proteção com potencial diagnóstico e terapêutico. Finalmente, nossas descobertas sugerem que as vias a jusante de IRE1, uma das mais importantes proteínas transdutoras do RE, têm papéis contrastantes na infiltração imune, representando um potencial mecanismo pelo qual a UPR afeta a sobrevida dos pacientes com glioblastoma.

Palavras-chave: Glioblastoma. Resposta a proteínas mal enoveladas. Estresse do retículo endoplasmático. Transcriptômica. Sequenciamento de RNA de célula única.

ABSTRACT

The endoplasmic reticulum (ER) is the main site of protein folding and quality control. The dysregulation of cellular processes related to protein folding and trafficking leads to the accumulation of misfolded proteins in the ER, triggering ER stress. To deal with this stress, cells activate a signaling cascade called unfolded protein response (UPR). The UPR is an adaptive process that increases the protein folding capacity of the ER to restore homeostasis and maintain cell viability and function. However, if the stress is permanent or intense, these signaling pathways can induce cell death by apoptosis. Several studies have demonstrated a relevant role of UPR in tumor development and progression, and the modulation of the ER stress machinery as an anticancer strategy has already been reported. Therefore, given the urgent need to improve the current standard of care for glioblastoma (GBM), an aggressive tumor with a median survival of 15 to 18 months, modulating specific components of the UPR or inducing acute ER stress are promising therapeutic strategies. The aim of this study was to characterize the transcriptional profile of the UPR in patients with GBM through the exploration of population and single-cell gene expression data. Our analyzes show that the expression of ER stress-related genes shows high intra and intertumoral heterogeneity. Furthermore, we found the UPR highly upregulated in GBM and identified novel risk and protective factors with diagnostic and therapeutic potential. Finally, our findings suggest that downstream pathways of IRE1, one of the most important ER transducer proteins, have contrasting roles in immune infiltration, representing a potential mechanism by which the UPR impacts glioblastoma patient survival.

Keywords: Glioblastoma. Unfolded protein response. Endoplasmic reticulum stress. Transcriptomics. Single-cell RNA-sequencing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| ATF6 | <i>Activating transcription factor 6</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| ERAD | Degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático, do inglês <i>endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i> |
| GBM | Glioblastoma |
| IRE1 | <i>Inositol-requiring enzyme 1</i> |
| ORF | Fase de leitura aberta, do inglês <i>open reading frame</i> |
| PERK | <i>Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i> |
| RE | Retículo endoplasmático |
| RIDD | Decaimento regulador dependente de IRE1, do inglês <i>regulated IRE1-dependent decay</i> |
| RNA | Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i> |
| RNA _m | RNA mensageiro |
| RNA-seq | Sequenciamento de RNA, do inglês <i>RNA sequencing</i> |
| scRNA-seq | Sequenciamento de RNA de célula única, do inglês <i>single-cell RNA sequencing</i> |
| TMZ | Temozolomida |
| UPR | Resposta a proteínas mal enoveladas, do inglês <i>unfolded protein response</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1. O ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E A RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS..... | 10 |
| 1.1.1. PERK | 11 |
| 1.1.2. IRE1 | 12 |
| 1.1.3. ATF6 | 12 |
| 1.1.4. Indução de apoptose sob estresse do RE | 14 |
| 1.2. O ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM CÂNCER | 14 |
| 1.2.1. Glioblastoma multiforme e a resposta a proteínas mal enoveladas | 16 |
| 1.2.2. A resposta a proteínas mal enoveladas como alvo terapêutico .. | 17 |
| 1.2.3. A resposta a proteínas mal enoveladas no microambiente tumoral | 19 |
| 1.3. A TRANSCRIPTÔMICA NO ESTUDO DO CÂNCER | 20 |
| 2. OBJETIVOS | 22 |
| 2.1. JUSTIFICATIVA | 22 |
| 2.2. OBJETIVO GERAL | 22 |
| 2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| 3. ARTIGO CIENTÍFICO | 23 |
| ABSTRACT | 24 |
| HIGHLIGHTS | 25 |
| INTRODUCTION..... | 25 |
| MATERIALS AND METHODS | 27 |
| Data origin | 27 |

| | |
|---|-----------|
| scRNA-seq processing and analysis | 28 |
| ER stress gene signature..... | 28 |
| Differential expression analysis | 29 |
| Kaplan-Meier analysis..... | 29 |
| Cox regression analysis..... | 30 |
| Immune cell markers and meta-signatures expression analysis..... | 30 |
| Correlation of single-cell data | 30 |
| RESULTS..... | 31 |
| Characterization of UPR gene expression in the tumor microenvironment | 31 |
| UPR is highly upregulated in GBM patient samples | 33 |
| Identification of novel risk and protective UPR factors in GBM..... | 34 |
| Opposite roles of IRE1 downstream pathways in patient prognosis and immune infiltration..... | 35 |
| DISCUSSION..... | 36 |
| CODE AVAILABILITY | 40 |
| AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT..... | 40 |
| REFERENCES..... | 41 |
| SUPPLEMENTARY FIGURES..... | 52 |
| SUPPLEMENTARY TABLE LEGENDS | 56 |
| 4. DISCUSSÃO | 57 |
| 5. REFERÊNCIAS DO TEXTO PRINCIPAL | 65 |

1. INTRODUÇÃO

1.1.O ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E A RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS

O retículo endoplasmático (RE) é uma rede de túbulos e vesículas interconectados que se comunicam com o envoltório nuclear. Essa organela é responsável pela síntese, enovelamento e processamento de mais de um terço de todas as proteínas celulares. Proteínas destinadas ao retículo, à membrana plasmática, ao complexo de Golgi, aos lisossomos ou que serão secretadas são sintetizadas nos ribossomos associados à membrana do retículo. Uma vez no lúmen do RE, as proteínas são enoveladas em suas conformações tridimensionais e sofrem modificações pós-traducionais. Esses processos são catalisados por proteínas residentes do RE como chaperonas, enzimas glicosilantes e oxido-redutases (HETZ; PAPA, 2018). Para manter um proteoma saudável, o RE contém mecanismos complexos de controle de qualidade, que garantem um enovelamento e um tráfego de proteínas eficientes, além de removerem as proteínas mal enoveladas através do processo de degradação de proteínas associadas ao RE (ERAD, do inglês *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*), em que as proteínas não enoveladas são transportadas ao citosol para serem ubiquitinadas e posteriormente degradadas pelo proteassoma 26S (TSAI; WEISSMAN, 2010).

A síntese e o enovelamento proteicos são altamente sensíveis a alterações da homeostase do retículo endoplasmático, que podem ser causadas por mudanças nos níveis de cálcio ou no estado redox do RE, privação de nutrientes, hipóxia, mutações que gerem agregação da proteína mutada ou impeçam o correto enovelamento da mesma, entre outros (HETZ; PAPA, 2018; READ; SCHRÖDER, 2021). Essas perturbações podem gerar um desequilíbrio entre a carga de proteínas que entra no RE e a capacidade de enovelamento proteico, acarretando um acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do retículo, condição conhecida como estresse do retículo endoplasmático. Sob estresse do RE, ocorre a ativação da resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês *unfolded protein response*). A UPR é um complexo conjunto de vias de sinalização interconectadas que visam restaurar a homeostase do RE e preservar a função celular por meio do ajuste da capacidade de enovelamento do RE de forma dinâmica. Isso ocorre através de dois principais eventos celulares: (1)

a atenuação da tradução proteica geral e a degradação de proteínas mal dobradas através de ERAD; e (2) o aumento da transcrição de diversos genes-alvo, principalmente genes codificadores de proteínas envolvidas no enovelamento proteico, como chaperonas, para aumentar a capacidade de enovelamento do retículo (HETZ; PAPA, 2018; HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). No entanto, o estresse crônico ou irreversível leva à morte celular por apoptose (HETZ, 2012). As vias da UPR consistem em três cascatas de sinalização principais iniciadas por proteínas transmembrana do RE: PERK, IRE1 α e ATF6 (Figura 1). O mecanismo de ativação desses três sensores ainda não é totalmente conhecido, mas se sabe que existe o envolvimento da proteína chaperona GRP78. Em condições normais, GRP78 se liga constitutivamente aos domínios luminiais dessas três proteínas, impedindo a ativação. Sob condições de estresse, GRP78 é recrutada pelas proteínas mal dobradas e se dissocia dos sensores, levando à oligomerização e à autofosforilação de PERK e IRE1 α , bem como o transporte de ATF6 para o complexo de Golgi (HETZ; PAPA, 2018; HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020).

1.1.1. PERK

PERK é uma quinase transmembrana do tipo I que, sob estresse do retículo, sofre oligomerização e trans-autofosforilação. Quando ativa, PERK fosforila o fator de iniciação da tradução eIF2 α , o que leva a uma atenuação transitória da síntese proteica, limitando o influxo de proteínas recém-sintetizadas no RE e aliviando o acúmulo de proteínas não enoveladas (HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). Concomitantemente, a fosforilação de eIF2 α permite a tradução de ORFs a jusante que não seriam traduzidas em condições normais, como é o caso da ORF que codifica o fator de transcrição ATF4 (HARDING *et al.*, 2000). ATF4 ativa a transcrição de genes envolvidos na resposta antioxidante, no metabolismo de aminoácidos, na síntese proteica e no processo de autofagia. ATF4 também participa de uma retroalimentação negativa que gera a desfosforilação de eIF2 α através da regulação positiva da expressão de GADD34, o que é essencial para a retomada da síntese proteica assim que o estresse é resolvido. Sob estresse crônico, ATF4 contribui para a indução de apoptose, visto que ele é conhecido por regular a expressão de CHOP, um fator de transcrição envolvido na ativação da expressão de proteínas pró-apoptóticas, como TRIB3. Além da fosforilação de eIF2 α e seus subsequentes efeitos, PERK também

desencadeia a importação nuclear de NRF2, um regulador da expressão de genes envolvidos na resposta antioxidante (CULLINAN *et al.*, 2003).

1.1.2. IRE1

IRE1 α é uma proteína transmembrana do tipo I que contém um domínio de serina/treonina quinase e um domínio de endoribonuclease (RNase) em sua porção citosólica. Quando ativa, IRE1 α inicia a via de sinalização mais conservada da UPR. Em leveduras, modelo em que a UPR foi inicialmente descoberta, há apenas a via originada da proteína ortóloga de IRE1 α (Ire1), o que tornou essa a via mais estudada e conhecida (READ; SCHRÖDER, 2021). De forma semelhante à PERK, IRE1 α se oligomeriza e se autofosforila sob estresse do retículo, induzindo uma mudança conformacional que ativa sua atividade de RNase. IRE1 α retira um pequeno íntron de 26 nucleotídeos do RNAm que codifica o fator de transcrição XBP1. Esse evento não-convencional de *splicing* gera uma mudança na fase de leitura do RNAm e resulta na expressão de um fator de transcrição estável e ativo sob condições de estresse. XBP1 regula a expressão de genes envolvidos no enovelamento e transporte de proteínas, assim como na degradação de proteínas mal enoveladas (CALFON *et al.*, 2002). O domínio de RNase de IRE1 α também regula a estabilidade de diversos RNAs mensageiros e microRNAs através de reações de clivagem endonucleotídica direta, processo chamado de decaimento regulador dependente de IRE1 (RIDD, do inglês *regulated IRE1-dependent decay*) (MAUREL *et al.*, 2014). Embora as bases moleculares e as funções desse processo ainda sejam bastante debatidas, RIDD pode servir para diminuir a abundância de RNAs mensageiros e assim aliviar a carga de proteínas no RE. Ademais, RIDD pode regular múltiplos processos celulares através da clivagem de RNAs-alvo específicos e já foi associado com a degradação de RNAs com funções pró-sobrevivência sob estresse de RE prolongado, contribuindo para a indução de apoptose (HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). Além disso, IRE1 α recruta e se associa à proteína TRAF2, que interage com outros fatores para finalmente ativar a quinase JNK, sendo esse outro mecanismo pelo qual IRE1 α pode levar à morte celular por apoptose (URANO *et al.*, 2000).

1.1.3. ATF6

ATF6 é uma proteína transmembrana do tipo II que contém um fator de transcrição do tipo zíper de leucina no seu domínio citoplasmático. Sob estresse do RE, ATF6 em seu tamanho completo transita do retículo para o complexo de Golgi, onde é clivada pelas proteases S1P e S2P, liberando um fragmento proteico contendo um fator de transcrição. O fator de transcrição ativo se transloca para o núcleo, onde ele induz a transcrição de genes que codificam chaperonas do RE, enzimas envolvidas no transporte, processamento, secreção e degradação de proteínas, e *XBP1*. (HAZE *et al.*, 1999; HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). ATF6 e *XBP1* atuam em paralelo, mas seus genes-alvo muitas vezes se sobrepõem, e já foi reportado que eles formam heterodímeros, gerando programas de expressão gênica específicos (HETZ; PAPA, 2018; YAMAMOTO *et al.*, 2007).

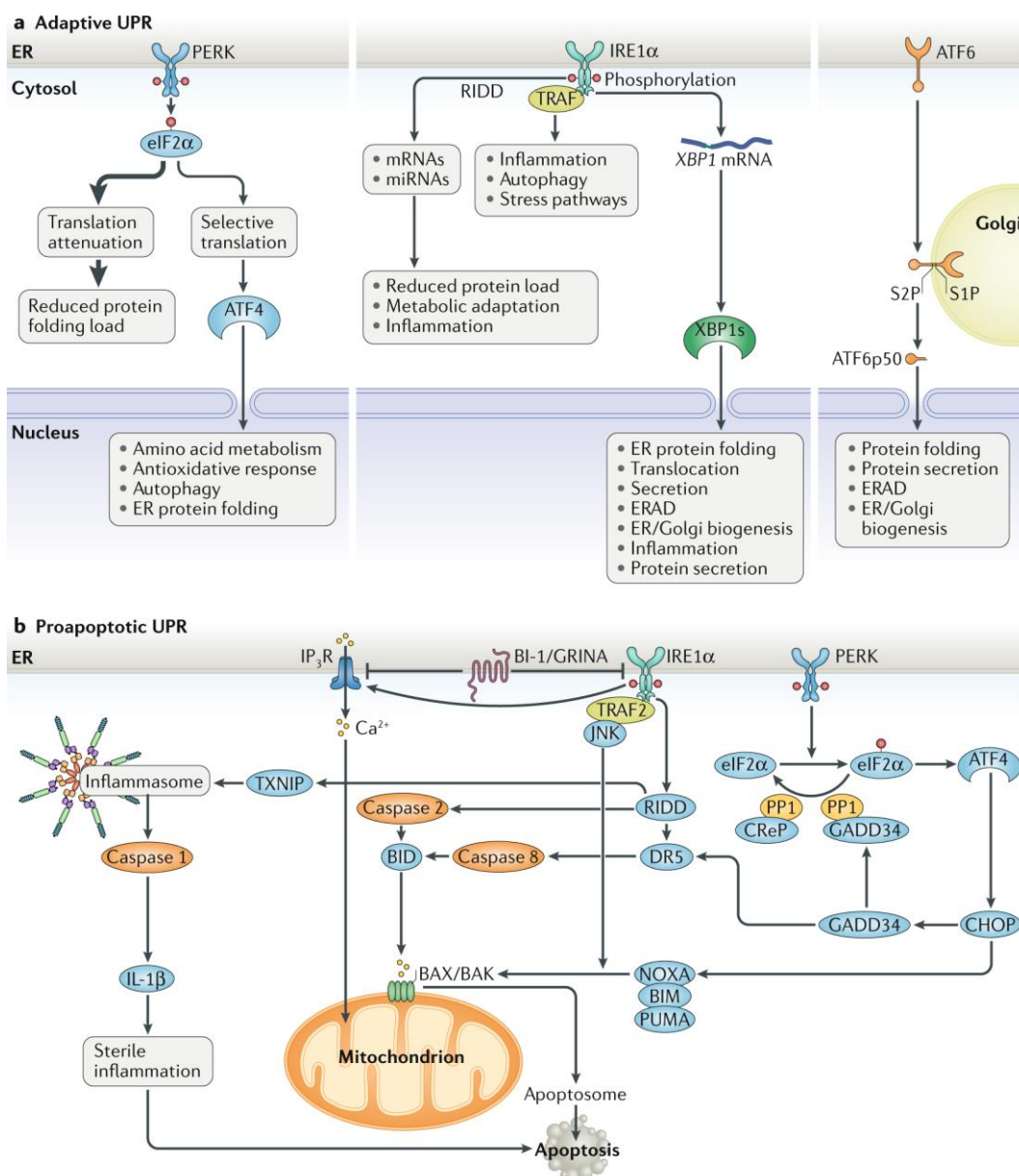


Figura 1. **As principais vias da UPR iniciadas a partir do RE.** Ilustração das vias de sinalização da UPR, divididas entre vias adaptativas e pró-apoptóticas. Fonte: HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020.

1.1.4. Indução de apoptose sob estresse do RE

Caso as respostas adaptativas da UPR falhem em restaurar a homeostase celular, a UPR eventualmente promove a morte celular por apoptose. A interação de diferentes mecanismos, ao invés de uma única via, controla a morte celular sob estresse do RE (Figura 1). As duas principais quinases da UPR, PERK e IRE1 α , contribuem para a indução de sinais pró-apoptóticos que no final convergem na via intrínseca da apoptose, envolvendo a ativação dos componentes pró-apoptóticos da família BCL-2 na mitocôndria e a concomitante ativação de caspase 3 (HETZ; PAPA, 2018; HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020; IURLARO; MUÑOZ-PINEDO, 2016). Embora diversos mecanismos pelos quais a UPR regula a apoptose foram propostos, o impacto e a dinâmica desses eventos no controle da morte celular ainda são especulativos. Na via de PERK, a hiperativação de PERK regula positivamente os fatores de transcrição CHOP e GADD153, que induzem a expressão de fatores pró-apoptóticos da família BCL-2, além de promoverem a retomada da síntese proteica e consequentemente o aumento de estresse oxidativo. IRE1 α , quando hiperativado, degrada RNAs-alvo essenciais para a sobrevivência celular por intermédio de RIDD. Por fim, IRE1 α também está envolvido na ativação de ASK1 através da associação com TRAF2 e na subsequente ativação de JNK, que pode regular a morte celular por apoptose sob estresse permanente.

1.2. O ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM CÂNCER

No microambiente tumoral, as células estão sob constante pressão de estímulos estressantes que induzem o acúmulo de proteínas mal dobradas no RE e geram uma condição permanente de estresse do retículo. Essas perturbações incluem hipóxia, privação de nutrientes, estresse oxidativo e baixo pH. Além dos estresses externos, a perda de genes supressores tumorais e a hiperativação de oncogenes, em adição à maior demanda metabólica dessas células altamente proliferativas, provocam um aumento na síntese proteica e consequentemente uma maior demanda

pelo enovelamento proteico (Figura 2) (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021; MADDEN *et al.*, 2019; OAKES, 2020).

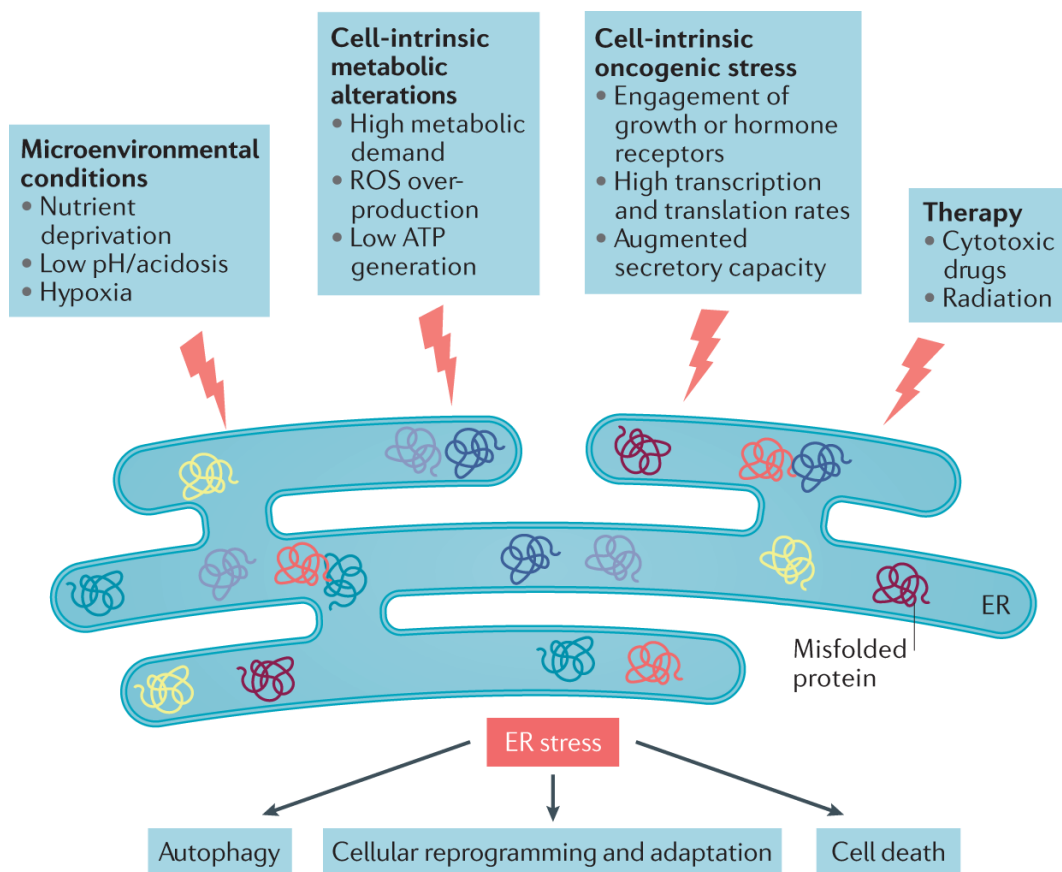


Figura 2. **Indutores de estresse de retículo endoplasmático no microambiente tumoral.** Ilustração de condições comumente presentes no microambiente tumoral que podem alterar a capacidade de enovelamento proteico do retículo endoplasmático e promover estresse do RE em células tumorais. Fonte: CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021.

Em resposta a essas condições, as células cancerígenas exploram respostas adaptativas aos estresses celulares, incluindo a UPR. As três principais vias da UPR são altamente ativas em tumores, como já foi documentado em uma variedade de cânceres, incluindo tumores hematopoiéticos, gliomas e carcinomas de mama, estômago, cólon, esôfago, pulmão, próstata, pâncreas e fígado (OAKES, 2020). Além disso, GRP78 e GRP94, duas importantes chaperonas do RE, foram encontradas aumentadas em diversos cânceres humanos (MADDEN *et al.*, 2019; OAKES, 2020). Embora os mecanismos ainda sejam debatidos, vários estudos pré-clínicos propõem

que a UPR auxilia o crescimento tumoral e está envolvida em processos como angiogênese, metástase e resistência à terapia (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021; OAKES, 2020). A ativação constitutiva das vias da UPR com funções citoprotetoras promove o aumento da capacidade de enovelamento proteico do RE nas células tumorais, o que permite a adaptação da via secretora às condições estressantes. Embora a UPR auxilie as células a atender às demandas de síntese e enovelamento proteico necessárias durante a tumorigênese, sua ativação intensa ou prolongada pode dar início ao processo de morte celular. A maneira pela qual as células cancerígenas regulam a UPR de modo a manter as funções citoprotetoras e pró-tumorais sem desencadear os mecanismos pró-apoptóticos dessa via ainda não é bem compreendida (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021; MADDEN *et al.*, 2019).

1.2.1. Glioblastoma multiforme e a resposta a proteínas mal enoveladas

Glioblastoma multiforme (GBM) é um glioma de grau IV que representa o câncer mais frequente e maligno dentre os tumores cerebrais. O tratamento padrão inclui ressecção cirúrgica máxima, seguida pelo tratamento com radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ), um agente alquilante (STUPP *et al.*, 2005). Contudo, a dificuldade da completa ressecção cirúrgica, devido à natureza agressiva e altamente infiltrante do tumor, em adição à alta resistência às terapias disponíveis, torna a recorrência tumoral incidente para a maioria dos pacientes (OBACZ *et al.*, 2017). Sendo assim, apesar de algumas melhorias no tratamento nos últimos anos, a doença é caracterizada por uma rápida progressão e por uma sobrevida mediana de apenas 15 a 18 meses após o diagnóstico, sendo que menos de 5% dos pacientes atingem 5 anos de sobrevida. (OSTROM *et al.*, 2014; PALLUD *et al.*, 2015). Para melhorar o prognóstico desses pacientes, é necessário um melhor entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento do GBM e pela resistência às estratégias terapêuticas utilizadas atualmente (PEÑARANDA FAJARDO; MEIJER; KRUYT, 2016).

Nos últimos anos, um crescente número de estudos vem implicando a resposta ao estresse do RE na patogênese e na resistência à terapia em modelos de GBM. Por se tratar de um tumor maligno e de rápido crescimento, as células do GBM são expostas a altos níveis de estresse celular e ativam respostas adaptativas como a UPR para lidar com tais condições. Uma elevada ativação da UPR já foi observada

em diversos modelos de GBM (PEÑARANDA FAJARDO; MEIJER; KRUYT, 2016), e já foram reportados aumentos nos níveis de RNAm de chaperonas do RE, como GRP94 e GRP78, e de fatores de transcrição da UPR, como XBP1, CHOP, ATF4 e ATF6, em linhagens celulares de GBM e xenotransplantes de glioma (EPPLÉ *et al.*, 2013; FATHALLAH-SHAYKH, 2005). Além disso, outros trabalhos mostraram elevados níveis proteicos de chaperonas do RE em xenotransplantes de diferentes tumores cerebrais e em amostras de pacientes com glioma (EPPLÉ *et al.*, 2013; GRANER *et al.*, 2009; GRANER; CUMMING; BIGNER, 2007; PYRKO *et al.*, 2007). Ainda, a ativação de PERK em GBM também foi acessada através dos níveis de fosforilação de PERK e de seu alvo eIF2 α , e foi encontrada uma correlação positiva entre o nível de ativação de PERK e o grau do tumor em gliomas (HOU *et al.*, 2015).

Os componentes da UPR também vêm sendo implicados como fatores de risco para a sobrevida dos pacientes com GBM: a expressão de *HSPA5*, que codifica a chaperona GRP78, foi associada a um pior prognóstico em pacientes, assim como a expressão dos genes *ERN1* (IRE1) e *XBP1* (LHOMOND *et al.*, 2018; PLUQUET *et al.*, 2013). Ademais, a via desencadeada por IRE1 α parece ter um papel importante em processos como angiogênese (DROGAT *et al.*, 2007), invasão (AUF *et al.*, 2010) e infiltração imune (LHOMOND *et al.*, 2018) *in vitro* e *in vivo*. Por fim, a UPR e, principalmente, a chaperona GRP78 foram associadas à resistência a terapia em GBM (EPPLÉ *et al.*, 2013; HOMBACH-KLONISCH *et al.*, 2018; PYRKO *et al.*, 2007), e a inibição de componentes da UPR aumentou a sensibilidade à radioterapia e à temozolomida em linhagens de glioma (KYANI *et al.*, 2018; PYRKO *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2019). Dessa forma, a atividade da UPR é significativamente elevada em GBM e contribui para o desenvolvimento tumoral, embora os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não sejam estabelecidos.

1.2.2. A resposta a proteínas mal enoveladas como alvo terapêutico

Existem duas principais abordagens na modulação da UPR que vêm sendo consideradas como potenciais estratégias terapêuticas em câncer: aumentar o estresse do RE, para que a capacidade de manter a homeostase seja excedida, induzindo apoptose nas células tumorais; ou inibir componentes das vias adaptativas da UPR, de forma a impedir suas funções pró-sobrevivência e pró-tumorais (MARKOULI *et al.*, 2020). Diferentes moléculas que modulam, ativando ou inibindo,

os componentes e as vias da UPR mostraram ter efeitos promissores em diversos tipos de câncer (ALMANZA *et al.*, 2019). Inibidores de PERK e IRE1 α apresentaram resultados benéficos em ensaios pré-clínicos, como é o caso do inibidor de PERK GSK2656157 para mieloma múltiplo e câncer de pâncreas, e dos inibidores de IRE1 α MKC-3946 e 4 μ 8c para mieloma múltiplo (ALMANZA *et al.*, 2019). MKC-8866, também um inibidor do sítio de RNase de IRE1 α , entrou em testes clínicos para câncer de mama avançado (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03950570>). A modulação de ATF6 é mais desafiadora, uma vez que ela não possui sítios de ligação passíveis de intervenção, além de sua estrutura cristalina ainda não estar disponível (ALMANZA *et al.*, 2019).

Em GBM, estudos vêm demonstrando que tanto a modulação de componentes específicos da UPR quanto a indução de estresse do RE agudo são estratégias promissoras para o tratamento desse tipo tumoral, principalmente em combinação com os agentes terapêuticos já utilizados. Alguns estudos pré-clínicos apontaram um efeito sinérgico de indutores gerais de estresse do RE com TMZ, como a bufotionina e a fluoxetina (MARKOULI *et al.*, 2020). Em modelos *in vitro* de glioma, a indução de estresse do RE por indutores clássicos como salinomicina e tunicamicina interferiu no reparo de danos no DNA e sensibilizou as células à TMZ (XIPELL *et al.*, 2016), enquanto outro trabalho reportou resultados semelhantes com JLK1486, um novo agente indutor de estresse do RE (WEATHERBEE; KRAUS; ROSS, 2016). Além disso, a inibição de proteínas envolvidas no enovelamento proteico e que estão aumentadas em GBM, como a chaperona GRP78 e a proteína dissulfeto isomerase, se mostrou eficaz em combinação com TMZ em linhagens celulares de GBM (KYANI *et al.*, 2018; PYRKO *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2019).

O estudo e o melhor entendimento do funcionamento das vias da UPR vêm possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para diferentes doenças. Um número cada vez maior de ensaios clínicos baseados nessas vias está sendo realizado, embora ainda poucos desses estudos foquem em câncer (ALMANZA *et al.*, 2019). As drogas indutoras de estresse do RE agudo conhecidas interferem com funções celulares vitais sem discriminação entre células normais e malignas, dificultando seu uso clínico. Além disso, identificar os alvos da UPR mais eficientes a serem modulados ainda é muito limitado pela falta de conhecimento de vários dos mecanismos e das funções da UPR em câncer (MARKOULI *et al.*, 2020).

1.2.3. A resposta a proteínas mal enoveladas no microambiente tumoral

O microambiente tumoral compreende diferentes tipos celulares não-tumorais que possuem um papel essencial na progressão do câncer, como fibroblastos associados ao tumor, células endoteliais dos vasos sanguíneos circundantes e células imunes. Os leucócitos infiltrantes incluem tanto células da imunidade adaptativa (linfócitos T, células dendríticas, linfócitos B) quanto mediadores da imunidade inata (macrófagos, células *natural killers*), e possuem uma função dupla no câncer: podem eliminar as células malignas através da apresentação de antígenos associados ao tumor ou podem promover inflamação crônica e contribuir para a progressão tumoral (OBACZ *et al.*, 2019).

Além da ativação da UPR nas células malignas e suas diferentes funções já mencionadas no desenvolvimento e na progressão tumorais, essa não é a única manifestação da UPR no contexto do câncer. Os leucócitos infiltrantes também sofrem com condições ambientais estressantes, ativando a sinalização da UPR, que modula programas transcricionais específicos para cada tipo celular (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021). Para além da ativação intrínseca da UPR nas células imunes, diversas evidências sugerem que a UPR regula as interações entre o tumor e as células não-tumorais, promovendo angiogênese, inflamação e infiltração imune (ZANETTI *et al.*, 2022). A comunicação entre células tumorais e não-tumorais é mediada principalmente por moléculas secretadas, como fatores de crescimento e citocinas. Foi observado em modelos *in vitro* e *in vivo* que o estresse do RE pode ser transmitido das células malignas para as células do microambiente através da liberação de fatores solúveis, processo chamado de estresse do RE transmissível (JIANG *et al.*, 2020). Em células imunes, o estresse do RE transmissível provoca uma regulação transcricional positiva de genes de citocinas inflamatórias e moléculas imunossupressoras, impactando diretamente a infiltração imune e a progressão tumoral. Outras células estromais, como células epiteliais, fibroblastos, astrócitos e neurônios, podem ser afetadas pelos sinais da UPR provenientes das células tumorais, apesar de ainda pouco se conhecer sobre essas interações (OBACZ *et al.*, 2019).

As três vias principais da UPR foram associadas com a indução de respostas pró-inflamatórias através da sinalização de NFκB (OBACZ *et al.*, 2019). Entretanto, a via da UPR mais estudada no contexto da interação tumor-estroma e da modulação da resposta imune é IRE1-XBP1 (RUBIO-PATIÑO *et al.*, 2018). Já foi reportado que

o fator de transcrição XBP1 induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF α em resposta a estresse do RE em macrófagos. As citocinas por sua vez podem induzir a ativação da UPR, criando uma retroalimentação que amplifica a resposta inflamatória (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021; OBACZ *et al.*, 2019). Tanto a inibição quanto o *knockout* de IRE1 em macrófagos atenuou o desenvolvimento de um fenótipo imunossupressor, e o silenciamento de XBP1 em células T CD8+ aumentou sua atividade antitumoral (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021; ZANETTI *et al.*, 2022). Estudos evidenciaram também um envolvimento da via PERK-CHOP na polarização de macrófagos, bem como na expressão de citocinas em células dendríticas (OBACZ *et al.*, 2019; ZANETTI *et al.*, 2022).

Embora o envolvimento da UPR na comunicação tumor-estroma e na infiltração imune seja evidente, o estudo desses aspectos ainda é recente, e mais investigações são necessárias. O entendimento dos mecanismos pelos quais a UPR afeta o microambiente tumoral abre oportunidades para a modulação da UPR como ferramenta para um maior controle imunológico do câncer.

1.3.A TRANSCRIPTÔMICA NO ESTUDO DO CÂNCER

A transcriptômica é uma ferramenta poderosa para o entendimento dos mecanismos moleculares por trás da tumorigênese e da progressão tumoral, e pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento de câncer. Abordagens transcriptômicas populacionais, como microarranjo e RNA-seq, são as ferramentas mais amplamente utilizadas para a compreensão da biologia do câncer. Encontrar genes diferencialmente expressos entre tumores e tecidos normais, ou entre diferentes subtipos e estágios da mesma doença, é um grande foco de pesquisas, sendo muito utilizado para a identificação de potenciais biomarcadores, alvos terapêuticos, e assinaturas gênicas para diagnóstico (LI; WANG, 2021).

Embora ainda muito utilizadas e fundamentais para o estudo da biologia do câncer, essas metodologias que avaliam a expressão gênica populacional utilizam um tecido ou uma massa de células, o que resulta em uma mistura de diferentes perfis de expressão daquele material estudado. Os programas transcrpcionais de tumores são altamente heterogêneos, variando tanto entre as células tumorais devido a alterações genéticas somáticas e a regulações transcrpcionais distintas, quanto entre os diferentes tipos celulares infiltrantes presentes no microambiente tumoral. Perfis de

expressão de uma subpopulação de células ou um tipo celular específico que podem ser essenciais para o desenvolvimento do tumor ou para a resistência à terapia, por exemplo, acabam sendo ocultados pela expressão média da população. Essa limitação das abordagens populacionais impulsionou o surgimento do sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq, do inglês *single-cell RNA sequencing*).

O scRNA-seq vêm sendo cada vez mais utilizado para estudar a heterogeneidade intra-tumoral a nível de *single-cell*, permitindo a descoberta de tipos celulares raros e estados celulares em diferentes tumores. Além de possibilitar um melhor entendimento da biologia tumoral em geral, o estudo dos diferentes perfis transcricionais entre células do mesmo tumor é extremamente necessário no contexto da resistência à terapia, visto que ele permite a identificação de subpopulações raras resistentes e conseqüentemente pode facilitar a otimização de estratégias terapêuticas. Ademais, usando scRNA-seq, é possível caracterizar as populações de células não-malignas dentro do microambiente tumoral, que possuem papéis importantes em processos como progressão tumoral, metástase e resistência à terapia.

2. OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a necessidade urgente de melhorar o padrão de tratamento de GBM, a busca por novos alvos para intervenção terapêutica é primordial. Estudos recentes indicam que a modulação de componentes específicos da UPR ou a indução de um estresse do RE agudo são estratégias terapêuticas promissoras a serem usadas em combinação com os tratamentos já existentes. Contudo, há uma escassez de investigações abrangentes dessa sinalização em pacientes com GBM, uma vez que a maioria dos estudos utiliza linhagens celulares ou modelos animais. Sendo assim, uma caracterização ampla dos genes da UPR em pacientes com GBM é essencial para um melhor entendimento do papel da via na progressão desse tipo tumoral.

2.2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho é realizar uma caracterização transcriptômica abrangente da resposta a proteínas mal enoveladas em pacientes com glioblastoma.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Caracterizar a expressão da UPR no microambiente tumoral em amostras de pacientes com GBM;
- b) Analisar a expressão diferencial dos principais genes da UPR em amostras de pacientes com GBM e amostras de tecido cerebral normal;
- c) Avaliar o impacto dos principais genes da UPR na sobrevida dos pacientes com GBM.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Transcriptional characterization of unfolded protein response in glioblastoma reveals novel genes associated with patient survival” foi formatado conforme normas de publicação requeridas pelo periódico Cancer Letters.

Title: Transcriptional characterization of unfolded protein response in glioblastoma reveals novel genes associated with patient survival

Authors: Fernanda Dittrich Pinto Oliveira^{1 2}, Rafael Paschoal de Campos³, Luiza Cherobini Pereira^{1 2}, Lisiane B. Meira⁴, Guido Lenz^{1 5}

1 Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2 Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

3 German Cancer Research Center (DKFZ), Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany.

4 Department of Clinical and Experimental Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, GU2 7WG Guildford, United Kingdom

5 Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. lenz@ufrgs.br.

Abstract

Dysregulation of cellular processes related to protein folding and trafficking leads to the accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER), triggering ER stress. To deal with ER stress, cells activate the unfolded protein response (UPR) signaling cascade. The UPR is an adaptive process that increases the protein folding capacity of the ER to restore ER homeostasis and maintain cell viability and function. Several studies have demonstrated a relevant role of the UPR in tumor progression and targeting the ER stress machinery as anticancer strategy was already reported. This work explores both single-cell and bulk expression data to characterize the UPR transcriptional profile in glioblastoma, a devastating disease with a median survival of 15 to 18 months. Our analysis shows that ER stress-related gene expression displays high intra- and inter-tumor heterogeneity. Moreover, we find the UPR is highly upregulated in GBM and identify novel risk and protective factors with diagnostic and therapeutic potential. Finally, our findings suggest that pathways downstream to the ER sentinel IRE1 have contrasting roles in immune infiltration, representing a potential mechanism by which the UPR impacts glioblastoma patient survival.

Keywords: glioblastoma; unfolded protein response; endoplasmic reticulum stress; transcriptomics; single-cell RNA-sequencing.

Highlights

- Expression of ER stress markers displays high intra- and inter-tumor heterogeneity.
- UPR is highly upregulated in GBM patient samples.
- We identified five risk factors and two protective factors among UPR genes in GBM.
- *XBP1* and *MAPK8* have contrasting roles in patient prognosis and immune infiltration.

1. Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) is the major site for protein folding and quality control, handling approximately one-third of all the proteins produced in the cell [1]. Perturbations in cellular homeostasis, including hypoxia, nutrient deprivation, redox changes, and loss of calcium homeostasis, can lead to an imbalance between the protein load entering the ER and the ER's protein folding capacity, which results in ER stress and subsequent activation of the unfolded protein response (UPR). The UPR aims to restore protein homeostasis, by increasing ER folding capacity, attenuating general translation, and activating the clearance of misfolded proteins through the ER-associated degradation (ERAD) system [2–4]. However, chronic or irreversible ER stress leads to cell death by apoptosis [5,6]. The UPR signaling cascades initiate via the activation of three ER transmembrane sensors: PERK, IRE1 α , and ATF6. Under ER stress, PERK phosphorylates and activates the eIF2 α kinase, which in turn attenuates general translation while increasing the translation of the transcription factor ATF4 [7]. IRE1 triggers two major downstream outputs: the activation of JNK, a kinase implicated in apoptosis induction [8,9], and the activation of the transcription factor XBP1 by splicing, which drives the upregulation of chaperones, ERAD, and lipid biosynthesis [10,11]. ATF6 traffics from the ER to the Golgi apparatus, where it is cleaved and activated into a transcription factor that translocates to the nucleus and upregulates mainly chaperone genes and *XBP1* [12–14].

Glioblastoma (GBM) is a lethal disease with a median survival of fewer than 15 months [15]. The standard treatment is surgical resection, followed by radiotherapy and temozolomide chemotherapy [16]. GBM tumors are aggressive and highly chemo- and radio-resistant, and this resistance has been associated with an upregulation in stress response pathways, including the UPR, that allow glioblastoma cells to better cope with intrinsic and extrinsic insults [17]. Several studies have proposed a role for the UPR in chemoresistance in glioma and other cancer types [18–23], and the inhibition of UPR components was associated with increased sensitivity in GBM models [19,24,25]. Different modulators that target the UPR-transducer protein pathways have shown promising beneficial effects in various cancers in preclinical trials, such as the PERK inhibitor GSK2656157 for pancreatic cancer, the IRE1 inhibitors MKC-3946 and 4 μ 8c for multiple myeloma, and the IRE1 inhibitor MKC-8866 that entered clinical testing for advanced breast cancer (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03950570>) [26]. Therefore, targeting specific UPR components [24,25,27,28] or inducing acute ER stress [29–31] may prove beneficial for glioblastoma therapeutics.

GBM cells, xenograft tumors, and patient samples show elevated chaperone protein and transcript levels [23,32–34], especially *HSPA5*, a gene that has been correlated with poor prognosis in GBM patients [23]. Moreover, studies have identified a role for the IRE1 branch in angiogenesis [35], tumor cell invasion [36], and immune infiltration [37] in GBM models, as well as associated the IRE1-XBP1 pathway with reduced patient survival [37,38]. Yet, only a few UPR genes have been investigated in GBM. Besides, most studies employed cultured cells or animal models, and therefore a global characterization of the UPR in GBM patients is lacking [23,39]. Furthermore, the UPR also plays an important role in the biology of non-malignant cell types and the tumor-stroma interactions, and recent reports showed it triggers proinflammatory and immunosuppressive responses in tumor-infiltrating immune cells [40–42]. Thus, the entire tumor ecosystem must be considered to enable a complete understanding of how the UPR affects GBM.

Given the therapeutic potential of targeting the UPR in this devastating disease and the dearth of comprehensive investigations of this process in GBM patients, our aim with this work was to characterize the UPR transcriptional profile in glioblastoma patients through analysis of both single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) and bulk expression data. We investigated ER stress-related gene expression within the tumor

microenvironment using scRNA-seq data as well as evaluated the differential expression and the impact on survival of the main UPR genes through bulk expression profiles. We show that ER stress-responsive genes are activated in both malignant and non-malignant cell types, with high intra- and inter-tumor heterogeneity. Moreover, we find the UPR is highly upregulated in GBM patients' samples and identify novel risk and protective factors with diagnostic and therapeutic potential in this aggressive and lethal cancer. Finally, our findings with both single-cell and bulk data suggest that pathways downstream to the ER sentinel IRE1 have contrasting roles in immune infiltration, representing a potential mechanism by which the UPR impacts glioblastoma patient survival.

2. Materials and Methods

2.1. Data origin

Published single-cell RNA-seq data processed with 10X Genomics were obtained from Neftel et al. 2019 [43]. Twenty six percent of the sequenced cells whose number of detected genes was less than half or more than twice the mean number of genes detected across cells coming from the same tumor were already excluded in the original article [43], and we further removed the 539 cells from pediatric patients. We analyzed 30,401 genes across 15,662 GBM cells from 9 tumors (*Table S1*). Microarray expression profiling data of 401 patient samples and RNA-seq expression data of 155 patient samples with clinical information were obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) Firehose Legacy dataset and TCGA PanCancer Atlas dataset (*Table S2*), respectively, through the cBioPortal for Cancer Genomics (www.cbioportal.org) [44,45]. These data were used for both the Cox proportional hazards regression analyses and the Kaplan-Meier curves. The differential expression analysis between normal and GBM samples and across glioma grades was performed using microarray expression data from the GEO Platform GPL570 (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array) obtained through the Gene Expression database of Normal and Tumor tissues 2 (Gent2) [46]. The expression profiling data of the normal brain tissue samples was obtained from 33 different GEO series (n=844), and the expression data of the GBM tissues was from 11 GEO series (n=408) (*Table S3*). To compare expression between low-grade glioma (LGG) and GBM samples, we used RNA-seq expression

data of 514 (LGG) and 160 (GBM) patient samples from TCGA PanCancer Atlas dataset.

2.2. scRNA-seq processing and analysis

Single-cell data analysis was performed in R software (R Core Team, www.R-project.org) using the *seurat* package (version 4.0, www.satijalab.org/seurat/) [47]. Since data were already processed as described in *Material and Methods* [43], we skipped filtering and quality control steps. Normalization and variance stabilization of molecular count data was carried out by SCTransform, a normalization method specific for scRNA-seq experiments. Following a *seurat* workflow, we assigned each cell a cell-cycle score, based on its expression of G2/M and S phase markers [48], and regressed out the difference between these two scores. Subsequently, data dimensionality reduction was performed using a principal component analysis (PCA), and the first 25 principal components were used in the downstream analyses. The expression profiles were then clustered through a graph-based approach, by which we first constructed a k-nearest neighbor graph based on distances in PCA space and then applied the Louvain algorithm, a modularity optimization technique. The resolution parameter was set to 1. Clustering results were visualized using two-dimensional Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP). Based on the expression of reported markers [43], the clusters were identified into four major cell types (tumor cells, macrophages, oligodendrocytes, and T cells) and further analyzed.

2.3. ER stress gene signature

To create an ER stress gene signature, we analyzed transcriptome profiles of glioma cells treated for 2 and 6 hours with thapsigargin and tunicamycin, classical ER stress inducers, from Reich et al. 2020 [49]. The most significantly upregulated genes (all $p < 0.005$ and $\log_2FC > 1.60$) across these conditions were selected and only those upregulated in at least two experimental conditions were chosen for the signature. To validate the meta-signature, we analyzed the differential expression of the signature genes in four GEO studies (GSE7806, GSE24497, GSE21979 and GSE107859) that treated different brain tumor cell lines with tunicamycin, thapsigargin or erstressin (*Fig.*

S1, Table S4). This 37-gene signature was used for further analyses of the single-cell expression data (Table S5).

2.4. Differential expression analysis

For both the differential expression analyses and the survival analyses, we examined the behavior of an additional set of 25 UPR genes curated from the literature and that are well known components of the different UPR branches [2–6]. The differential expression analysis was determined by comparing the microarray expression levels of these 25 UPR genes in normal brain tissue samples with GBM tumor samples. Normality was rejected using the Shapiro-Wilk normality test and therefore the nonparametric Mann-Whitney U test was chosen. The comparison between expression in low-grade glioma (LGG) and GBM samples was performed in the same way. To assess differential expression across glioma grades, Kruskal Wallis test was carried out comparing data among grade II, III and IV glioma samples, and Dunn's test was performed for multiple comparisons. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Two-sided p-values <0.05 were statistically significant.

2.5. Kaplan-Meier analysis

Kaplan-Meier analyses were performed individually for each of the 25 UPR genes, using the median to separate patients with low and high expression. In addition, Kaplan-Meier analysis using two genes (*XBP1* and *MAPK8*) was performed dividing patients into 4 equal groups: patients showing high expression of both genes (High/High), patients showing low expression of both genes (Low/Low), and two other groups of patients showing one gene with high and the other with low expression (High/Low and Low/High). The cutoff lines were determined based on the correlation line between the two genes, generating two cutoff lines, the first on the correlation line, and a second perpendicular to that line, dividing the patients into 4 equal groups [50]. The data were prepared in the Microsoft Excel software and analyzed with the log-rank test through GraphPad Prism 8.0.2 software. P-values <0.05 were statistically significant.

2.6. Cox regression analysis

For all the 25 UPR genes, Cox regression models were performed to calculate the hazard ratio using mRNA expression z-scores and overall survival data. The models were adjusted for the impact of the clinical variable Sex or adjusted for the impact of both Sex and all other 24 genes. Diagnosis analysis based on weighted Schoenfeld residuals was used to test the proportional hazard assumption. Cox models were carried out using the R survival package (version 3.2-13, www.cran.r-project.org/package=survival).

2.7. Immune cell markers and meta-signatures expression analysis

Meta-signatures representing different cells of the immune system were previously described [51]. The meta-signatures were obtained by the average expression z-scores of the genes corresponding to each cell type. Expression of immune cell canonical markers and meta-signatures were evaluated in the Low *XBP1*/High *MAPK8* and High *XBP1*/Low *MAPK8* patient groups, divided as described in the Kaplan-Meier analysis section. The expression was also measured in the *XBP1* low and high and in the *MAPK8* low and high groups, both divided using the median as the cutoff. Mann-Whitney U test was carried out comparing microarray expression data from the TCGA cohort. The data were prepared in the Microsoft Excel software and analyzed through GraphPad Prism 8.0.2 software. P-values <0.05 were statistically significant.

2.8. Correlation of single-cell data

XBP1 and *MAPK8* average expression in tumor cells and percent of tumor cells expressing these genes were obtained for each patient from scRNA-seq data. For each patient, the *XBP1*/*MAPK8* ratio of these parameters was calculated, as well as the percentages of cells in each cell type (Table S6). Pearson's correlation was performed between *XBP1* and *MAPK8* parameters and its ratios with the percentages of cells in each cell type. The data were prepared in the Microsoft Excel software and analyzed through GraphPad Prism 8.0.2 software. P-values <0.05 were statistically significant.

3. Results

3.1. Characterization of UPR gene expression in the tumor microenvironment

Using published single-cell RNA sequencing data from Neftel et al. 2019 [43], we comprehensively investigated UPR gene expression in GBM cells and cells from the tumor microenvironment. Single-cell transcriptomic profiles for 30,401 genes across 15,662 cells from 9 tumors were analyzed (*Table S1*) aiming to assess both inter- and intra-tumoral UPR expression heterogeneity in glioblastoma samples. After normalization, cell-cycle regression, dimensionality reduction, and clustering - all performed using the R *seurat* package as described in *Materials and Methods* -, we visually inspected the computed clusters projecting the data onto two dimensions by UMAP. Based on the expression of reported cell-type specific markers, the clusters were identified and assigned into four major cell types: tumor cells, macrophages, oligodendrocytes, and T cells (*Fig. 1A*). Within each cell type, gene expression varied noticeably in cells from different patients, especially tumor cells and macrophages, as already reported [43] (*Fig. 1B*). Following the identification of cell types, we assessed the expression of the ER stress gene signature (*Table S5*) across cell types (*Fig. 1C and D, Table S6*). The signature was expressed in all four cell types, showing high expression in both tumor cells and macrophages, in agreement with prior studies [41]. When looking at four representative individual genes involved in UPR pathways and upregulated by ER stress, we observed a similar pattern: expression is present in all cell types but mainly in macrophages and tumor cells (*Fig. 1E and F*). Additionally, we noticed that both signature and expression of individual genes varied considerably between patients - while some tumors showed very low ER stress marker expression, others highly expressed the signature. (*Fig. 1B and C, Fig. S2*). Lastly, there was also heterogeneity within each patient – sub-groups of cells within the same tumor showed specific expression patterns. When comparing expression in tumor and macrophages cell populations, we noticed that the expression pattern is equivalent in both cell populations for each patient (*Fig. S2A*), although macrophages were the cell population with the highest ER stress signature expression in some patients, while in others, the signature was highly expressed mainly in tumor cells (*Fig. S2C and D*).

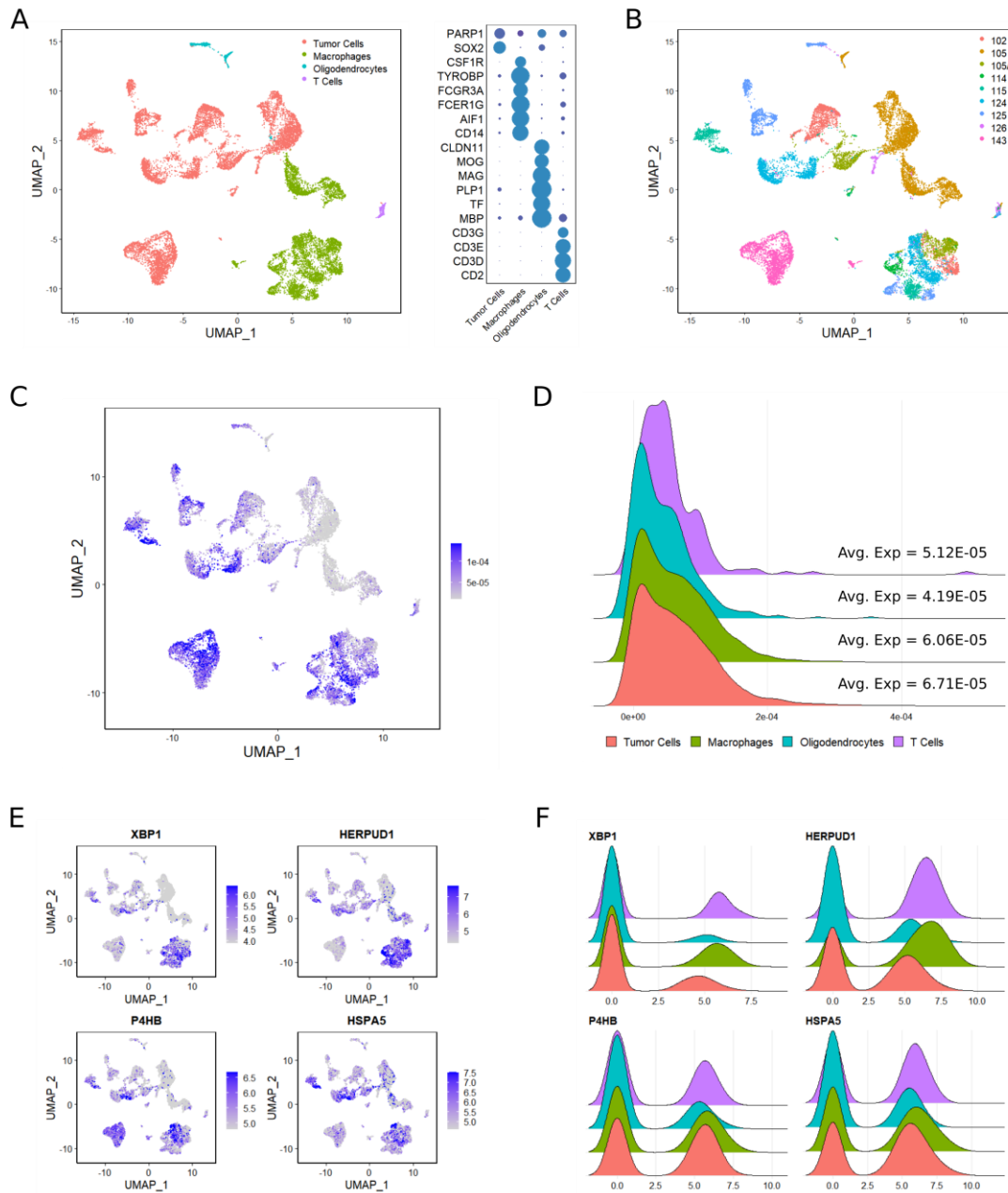


Figure 1. Characterization of UPR gene expression in the tumor microenvironment. (A) Identification via scRNAseq of cell populations from 9 glioblastomas. UMAP plot of all single cells. Cells are colored based on high expression of sets of marker genes for tumor cells (red), macrophages (green), oligodendrocytes (blue), and T cells (purple). On the right, expression of some marker genes used for the identification of cluster cell types, according to Neftel et al. 2019 [43]. (B) UMAP plot of all single cells, colored by patient. (C) Feature plot depicting expression of an ER stress gene signature. (D) Ridge plot of signature expression. Average signature expression is shown for each cell type. Feature (E) and Ridge (F) plots depicting genes involved in UPR. (F) The color code represents the four cell types as indicated in (D).

3.2. UPR is highly upregulated in GBM patient samples

As previously mentioned, a small number of UPR genes has been reported differentially expressed in GBM cells, and this number is even lower for analyses using patient samples [23,39]. To comprehensively study the UPR landscape in GBM patients, we evaluated the differential expression of the major UPR genes in GBM patient samples. We analyzed a set of 25 genes [2–6], comparing microarray expression data of 844 normal brain tissue samples and 408 GBM tumor samples obtained from GEO Platform GPL570 (*Table S3*). We observed elevated expression of most genes in tumor samples relative to normal brain tissue (*Fig. 2A, Fig. S3A*),

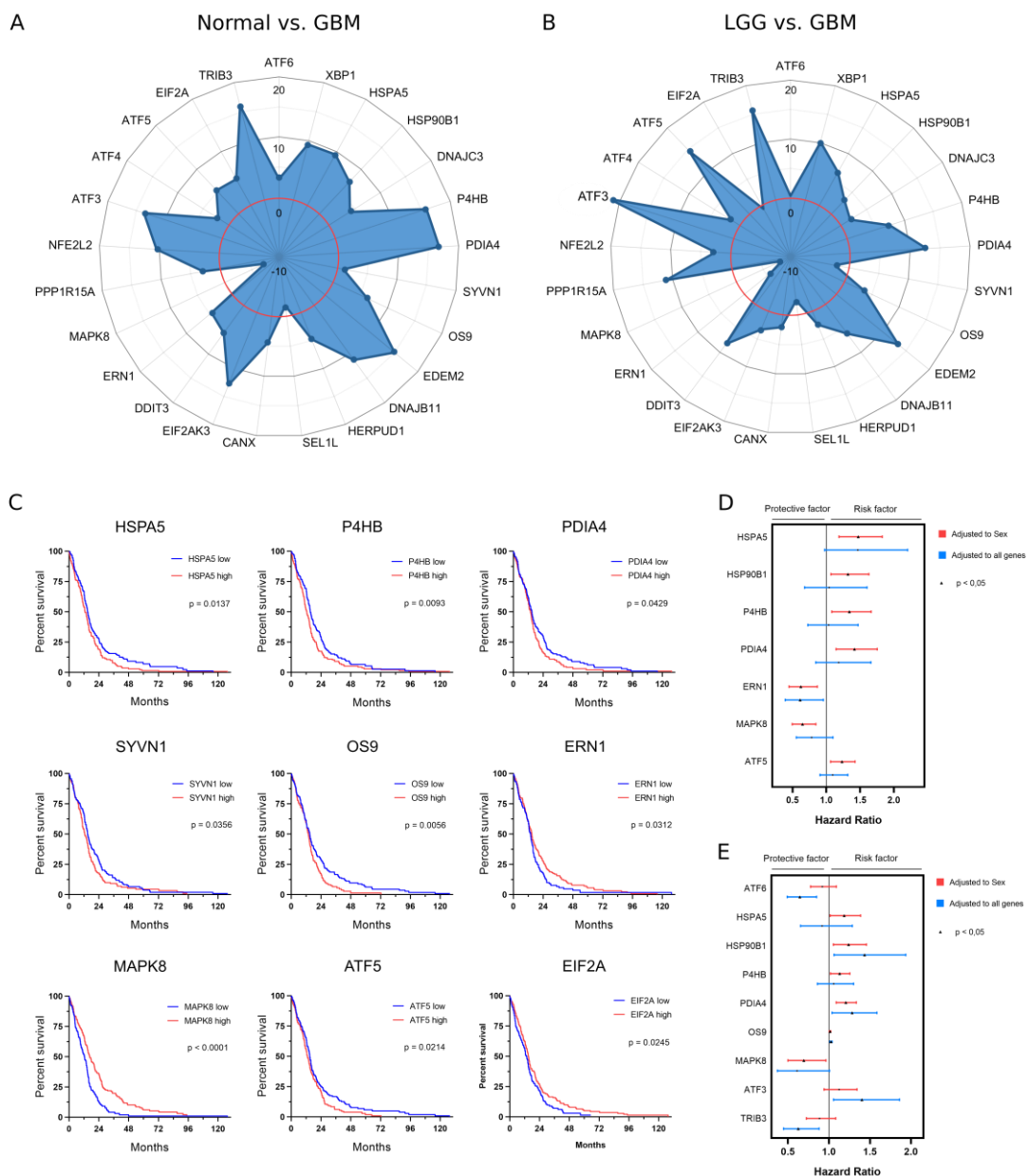


Figure 2. (A-B) Differential expression analysis of 25 UPR genes. (A) Radar charts showing the change in expression (%) of each gene between normal brain tissue and GBM samples. Mann-Whitney U test was carried out comparing the microarray expression data from GEO platform GPL570. (B) Radar charts showing the change in expression (%) between low-grade glioma (LGG) and GBM samples. Mann-Whitney U test was carried out comparing the RNA-seq expression data from TCGA cohort. The points in the chart vertices indicate a significant change in expression ($p < 0.05$) and the red line indicates zero change in expression. (C-E) Impact of individual UPR genes on patient survival. (C) Kaplan-Meier plots of the nine UPR genes that showed a significant impact on survival using microarray data from the TCGA cohort. Log-rank p values are indicated. Cox proportional hazard ratio of genes with significant impact adjusted only to the clinical variable Sex (in red) and adjusted to Sex and all other genes (in blue) using (D) microarray data and (E) RNA-seq data from TCGA cohorts.

supporting previous reports in glioblastoma and other cancers [52–54]. These genes include the three UPR transducers *EIF2AK3* (PERK), *ATF6*, and *ERN1* (IRE1); the transcription factors *XBP1*, *ATF4*, and *DDIT3* (CHOP); ER chaperones *HSPA5* (GRP78) and *HSP90B1* (GRP74); and targets of the mentioned genes, involved in folding machinery, ERAD pathway and others. The only two downregulated genes in tumor samples were *MAPK8*, which encodes the JNK protein, implicated in IRE1-mediated apoptosis [8,9], and *SEL1L*, whose product is a member of the ERAD system and associates with HRD1 (*SYVN1*) and OS9 to translocate misfolded proteins to the cytosol [55]. Moreover, we compared expression between low-grade glioma (LGG) and GBM samples as well as across glioma grades (*Fig. 2B, Fig. S3B and C*). Likewise, most UPR genes within the subset studied were overexpressed in GBM compared to LGG and their expression levels correlated with tumor grade. *SEL1L* and *MAPK8* were also downregulated in GBM when compared to LGG, and *MAPK8* expression was negatively correlated with tumor grade.

3.3. Identification of novel risk and protective UPR factors in GBM

Next, we evaluated the impact of individual UPR genes on patient survival. Kaplan-Meier analysis was carried out for each of the 25 UPR genes included in the UPR subset, of which nine exhibited prognostic significance in patients with GBM from the TCGA cohort (*Fig. 2C, Fig. S4A*). To further determine the prognostic implication of the UPR genes, multivariate Cox proportional hazard ratio analysis was performed for the same 25 genes adjusted only to the clinical variable Sex or adjusted to Sex and all other genes, using microarray and RNA-seq data from TCGA cohorts (*Fig. 2D and E, Fig. S4B and C, Table S7*). The Kaplan-Meier curves showed that high expression of six genes was associated significantly with shorter survival, while the high

expression of three genes was associated with better prognosis. Similarly, Cox survival analysis identified seven genes as risk factors and four as protective factors. Considering genes that were significant in both Kaplan-Meier and Cox analyses, we identified five risk factors - *HSPA5*, *P4HB*, *PDIA4*, *OS9*, and *ATF5* - and two protective factors - *ERN1* and *MAPK8*.

3.4. Opposite roles of IRE1 downstream pathways in patient prognosis and immune infiltration

Interested in the opposite roles of the IRE1 branch, which on one side leads to the induction of apoptosis by JNK and on the other triggers survival through XBP1-dependent activation of adaptive responses [8–11], we next focused on the role of *XBP1* and *MAPK8* in GBM biology. We performed a Kaplan-Meier analysis using these two genes to investigate the impact of *XBP1* and *MAPK8* gene interaction on survival. Patients were divided into 4 groups of equal size: High/High, Low/Low, High/Low, and Low/High, as described in *Materials and Methods*. We found that *MAPK8* and *XBP1*, both activated by the IRE1 branch, have opposite impacts on survival: patients with high *MAPK8* expression and low *XBP1* expression had significantly better prognoses than patients with low *MAPK8* expression and high *XBP1* expression (*Fig 3A*). Since it was previously reported that the IRE1 downstream pathways are associated with immune infiltration [37,56], we measured the expression of immune cell markers and meta-signatures in the Low-High and High-Low patient groups, as well as in the individual low and high expression groups (*Fig. 3B and C, Fig. S5A and B*). While high *XBP1* expression was associated with the infiltration of most of the immune cells, *MAPK8* expression had an opposite result. We then performed further analyses with single-cell data to investigate if these findings were not due to the intrinsic expression of the genes in immune cells. *XBP1* and *MAPK8* genes were expressed across all cell types, mainly in the macrophage population, as shown by their expression ratio (*Fig. S5C*). To assess whether expression of these two genes in tumor cells could be associated with immune infiltration, we compared *XBP1* and *MAPK8* tumor average expression ratio and the ratio of tumor cells expressing *XBP1* and *MAPK8* with the percent of immune cells in each sample (*Fig. 3D and E*). Both showed a significant correlation with Pearson's coefficient (r) of 0.79 and 0.69, respectively. *XBP1* and *MAPK8* expression in tumor cells alone correlated with the percent of immune cells

(*XBP1*: $r = 0.59$; *MAPK8*: $r = -0.26$), but their ratio showed a much stronger correlation ($r = 0.79$) (Fig. S5D). These results suggest that the IRE1 downstream pathways have opposite roles in patient prognosis and possibly in immune infiltration.

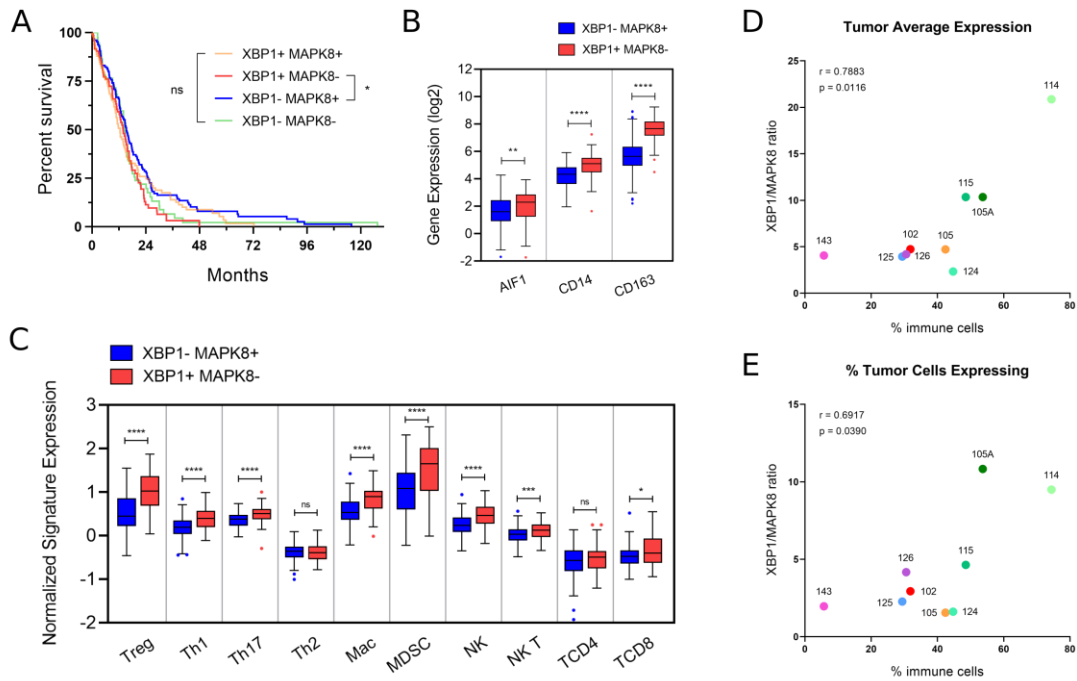


Figure 3. The IRE1 downstream pathways have opposite roles in patient prognosis and immune infiltration. (A) Kaplan Meier survival analysis based on the expression of *XBP1* and *MAPK8* was performed dividing patients into 4 groups: high *XBP1* expression and high *MAPK8* expression (*XBP1*+ *MAPK8*+, shown in orange), high *XBP1* and low *MAPK8* expression (*XBP1*+ *MAPK8*-, in red), low *XBP1* and high *MAPK8* (*XBP1*- *MAPK8*+, in blue) and both genes with low expression (*XBP1*- *MAPK8*-, shown in green). Only High-Low compared to Low-High was significantly different ($p=0.0331$). Expression of immune cell markers (B) and immune cell meta-signatures (C) in Low-High and High-Low groups. Mann-Whitney U test was carried out comparing microarray expression data from the TCGA cohort. (D-E) Comparison between *XBP1* and *MAPK8* tumor average expression ratio (D) and the ratio of tumor cells expressing *XBP1* and *MAPK8* (E) with percent of immune cells in each sample. In the scatter plot, each dot represents one of the 9 glioblastomas from scRNA-seq data. Samples' IDs are indicated. Pearson's correlation coefficient (r) and p -values (p) are shown for each analysis.

4. Discussion

Glioblastoma is a tumor without an effective treatment strategy. Thus, understanding the biological processes of GBM progression and searching for novel targets for therapeutic intervention is paramount. Despite the diverse roles of ER stress in cancer, emerging evidence has indicated that targeting the UPR is a promising strategy for GBM treatment. In our study, we demonstrated that the stress pathways of the UPR are highly upregulated in GBM tumors, identified UPR-related genes

Analyzing bulk data, we found that almost all UPR-related genes evaluated were upregulated in GBM patient samples compared with normal brain tissue and LGG samples and their expression also positively correlated with tumor grade. Most of the upregulated genes encode folding proteins such as chaperones, disulfide isomerases, and ERAD components. These genes were also identified as risk factors in the survival analyses. This is consistent with the view that the UPR cytoprotective branches assist the tumor's rapid growth and adaptation to stressful microenvironment conditions. The overexpression and prognosis relevance of *HSPA5* and the *PDI* family have already been reported in GBM models [23,24], to which we add other relevant genes, such as chaperone *HSP90B1* and ERAD components *OS9* and *SYVN1*.

These prosurvival genes are mostly upregulated by the ATF6 and IRE1-XBP1 branches. However, while *XBP1* alone did not have any significant impact on survival, *ATF6* was considered an independent protective factor using the Cox analysis. Although much remains to be discovered about the role of the ATF6 branch, it was identified here as a protective factor while its direct transcriptional target is a well-described risk factor (*HSPA5*) [23,32]. We hypothesize that the discrepancy between *ATF6* and *HSPA5* survival results could be explained by the presence of other transcription factors that take part in the regulation of *HSPA5* such as *XBP1*. Furthermore, ATF6 is not transcriptionally induced under ER stress but rather activated by cleavage, thus we are not able to fully access its activation and impact on survival by transcriptomics. Still, more work needs to be done to elucidate the role of *ATF6* in cancer and enlighten these open issues.

Although other ERAD genes were upregulated in GBM tumors and identified as risk factors, *SEL1L* was downregulated in GBM tissue compared with normal brain and LGG samples, contrary to previous studies that reported *SEL1L* protein expression to increase with malignancy in glioma cells and tissues [58,59]. However, this gene has a very complex structure made up of 21 exons featuring several alternative transcripts encoding for putative protein isoforms, which ensures protein flexibility and specificity. Therefore, *SEL1L* may play either an oncogenic or a tumor-suppressive role according to the cellular context or the isoform predominance [58], as it was found downregulated in breast and pancreatic cancer as well as upregulated in prostate, lung, and cervical cancers [60–64].

The other downregulated gene in GBM which was identified as an independent protective factor was *MAPK8*. Previous studies have shown a prognosis relevance of

the *MAPK8* gene and proposed that this was due to its role in programmed cell death [65,66]. *ERN1* (IRE1), the activator of *MAPK8* in the context of UPR signaling, was also identified as a protective factor. This contradicts a previous report on high *ERN1* expression being related to poor prognosis in patients with GBM [37]. *ERN1* was not identified as a prognosis factor when adjusted to *MAPK8* as a covariable (data not shown), suggesting that its relevance in prognosis was dependent on the protective role of *MAPK8*.

Regarding the PERK/eIF2 α /ATF4 branch, our results reflect the complexity of this pathway, that leads to an intricate balance between cytoprotective and cytotoxic outcomes. The *DDIT3* and *PPP1R15A* genes, coding for proteins implicated in apoptosis induction, were in fact upregulated in GBM samples. Even if this seems counterintuitive, similar results were reported in different cancers indicating these genes play a role in cytoprotective pathways such as autophagy [67–70]. On the other hand, *TRIB3*, an apoptosis-related gene activated by CHOP (*DDIT3*) [71], was identified as a protective factor. Moreover, *ATF3* and *ATF5*, induced by the eIF2 α /ATF4 pathway, were identified as risk factors, supporting previous reports in other cancers [72–74]. These genes are involved in prosurvival roles, regulating a cellular adaptive response network. Lastly, high expression of *EIF2A*, the upstream factor of *ATF4*, was correlated with a better prognosis. Different intrinsic and extrinsic stress pathways converge on the phosphorylation of eIF2 α , leading to the induction of autophagy, apoptosis, and immunogenic cell death [75]. However, considering that our methods do not enable us to evaluate the phosphorylation of the protein, it is hard to determine an accurate explanation for this result.

Interested in the opposite roles of the IRE1 branch, which on one side leads to the induction of apoptosis by JNK and on the other triggers survival through XBP1-dependent activation of adaptive responses, we performed survival analysis with these two genes. Consistent with their antagonistic roles in UPR signaling, patients with high *XBP1* expression and low *MAPK8* expression had shorter survival than patients with low *XBP1* and high *MAPK8* expression, confirming that the IRE1 downstream pathways have opposite roles in GBM prognosis. However, it is important to consider that we are not able to access neither *XBP1* mRNA splicing nor JNK (*MAPK8*) phosphorylation levels by these standard transcriptomic methods, and therefore this is not an indicative of their activation by IRE1 but a measure of *XBP1* and *MAPK8*

expression levels. Despite this caveat, studies that investigate how these pathways are co-regulated and contribute to cell survival or cell death are still lacking.

To further understand *XBP1* and *MAPK8* roles in GBM biology, we investigated the relation between expression of these genes and immune infiltration. Although the mechanisms underlying the association of the IRE1 downstream pathways and immune infiltration are not clear, previous reports showed that IRE1 can promote immunosurveillance or immune system evasion through activation of NF- κ B and regulation of damage-associated molecular patterns (DAMPs), cytokines, and transmissible ER stress (TERS) [40,56,76–79]. We therefore measured the expression of immune cell markers and meta-signatures and observed that patients with high *XBP1* expression and low *MAPK8* expression presented elevated expression of immune cell meta-signatures that were previously correlated with poor prognosis in GBM, such as macrophages, MDSC, Th1, Treg, and others [50]. When looking at single-cell data, we found that, despite both genes being highly expressed in immune cells, the *XBP1/MAPK8* expression ratio in tumor cells correlated strongly with the percentage of immune cells in each sample. This indicates a potential role of the IRE1 pathways in immune infiltration, though significantly more work needs to be done to assess the mechanisms underpinning this relationship.

In summary, we performed a comprehensive transcriptional characterization of the unfolded protein response in glioblastoma patients. Our study identified several novel UPR-related genes associated with GBM patient survival, providing potential prognostic and predictive biomarkers as well as promising targets for developing new therapeutic interventions in GBM treatment.

Code availability

The code to reproduce the analyses and figures described in this study can be found at www.github.com/fernandaoliveiraa/2022_GBMsinglecell.

Author contributions statement

FDPO: Conceptualization, formal analysis, investigation, data curation, writing - original draft, visualization. RPC: Conceptualization, writing - review & editing. LCP:

Conceptualization, writing - review & editing. LM: Writing - review & editing. GL: Conceptualization, writing - review & editing, supervision.

References

- [1] C. Hetz, E. Chevet, S.A. Oakes, Proteostasis control by the unfolded protein response, *Nature Cell Biology*. 17 (2015) 829–838. <https://doi.org/10.1038/ncb3184>.
- [2] Y.C. Tsai, A.M. Weissman, The Unfolded Protein Response, Degradation from the Endoplasmic Reticulum, and Cancer, *Genes & Cancer*. 1 (2010) 764–778. <https://doi.org/10.1177/1947601910383011>.
- [3] D.T. Rutkowski, R.J. Kaufman, That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress, *Trends in Biochemical Sciences*. 32 (2007) 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.09.003>.
- [4] P. Walter, D. Ron, The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation, *Science* (1979). 334 (2011) 1081–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1209038>.
- [5] C. Hetz, F.R. Papa, The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control, *Molecular Cell*. 69 (2018) 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.017>.
- [6] R. Iurlaro, C. Muñoz-Pinedo, Cell death induced by endoplasmic reticulum stress, *The FEBS Journal*. 283 (2016) 2640–2652. <https://doi.org/10.1111/febs.13598>.
- [7] H.P. Harding, I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, D. Ron, Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells, *Molecular Cell*. 6 (2000) 1099–1108. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00108-8).
- [8] F. Urano, X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H.P. Harding, D. Ron, Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1, *Science* (1979). 287 (2000) 664–666. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664>.
- [9] D. Han, A.G. Lerner, L. vande Walle, J.-P. Upton, W. Xu, A. Hagen, B.J. Backes, S.A. Oakes, F.R. Papa, IRE1 α Kinase Activation Modes Control Alternate

- Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates, *Cell*. 138 (2009) 562–575. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.017>.
- [10] H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, K. Mori, XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor, *Cell*. 107 (2001) 881–891. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00611-0).
- [11] M. Calton, H. Zeng, F. Urano, J.H. Till, S.R. Hubbard, H.P. Harding, S.G. Clark, D. Ron, IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA, *Nature*. 415 (2002) 92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>.
- [12] K. Lee, W. Tirasophon, X. Shen, M. Michalak, R. Prywes, T. Okada, H. Yoshida, K. Mori, R.J. Kaufman, IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response., *Genes Dev*. 16 (2002) 452–66. <https://doi.org/10.1101/gad.964702>.
- [13] K. Haze, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, K. Mori, Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress, *Molecular Biology of the Cell*. 10 (1999) 3787–3799. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787>.
- [14] K. Yamamoto, T. Sato, T. Matsui, M. Sato, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada, K. Mori, Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 α and XBP1, *Developmental Cell*. 13 (2007) 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.07.018>.
- [15] K. Anton, J.M. Baehring, T. Mayer, Glioblastoma Multiforme, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 26 (2012) 825–853. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2012.04.006>.
- [16] R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J.B. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R.O. Mirimanoff, Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma, *New England Journal of Medicine*. 352 (2005) 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.

- [17] R. Ojha, R.K. Amaravadi, Targeting the unfolded protein response in cancer, *Pharmacological Research*. 120 (2017) 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.04.003>.
- [18] S. Hombach-Klonisch, M. Mehrpour, S. Shojaei, C. Harlos, M. Pitz, A. Hamai, K. Siemianowicz, W. Likus, E. Wiechec, B.D. Toyota, R. Hoshyar, A. Seyfoori, Z. Sepehri, S.R. Ande, F. Khadem, M. Akbari, A.M. Gorman, A. Samali, T. Klonisch, S. Ghavami, Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response, *Pharmacology & Therapeutics*. 184 (2018) 13–41. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.017>.
- [19] P. Pyrko, A.H. Schönthal, F.M. Hofman, T.C. Chen, A.S. Lee, The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas, *Cancer Research*. 67 (2007) 9809–9816. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0625>.
- [20] A. Nagelkerke, J. Bussink, A.J. van der Kogel, F.C.G.J. Sweep, P.N. Span, The PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response affects radioresistance by interfering with the DNA damage response, *Radiotherapy and Oncology*. 108 (2013) 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.037>.
- [21] Z. Shi, X. Yu, M. Yuan, W. Lv, T. Feng, R. Bai, H. Zhong, Activation of the PERK-ATF4 pathway promotes chemo-resistance in colon cancer cells, *Scientific Reports*. 9 (2019) 3210. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39547-x>.
- [22] I.C. Salaroglio, E. Panada, E. Moiso, I. Buondonno, P. Provero, M. Rubinstein, J. Kopecka, C. Riganti, PERK induces resistance to cell death elicited by endoplasmic reticulum stress and chemotherapy, *Molecular Cancer*. 16 (2017) 91. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0657-0>.
- [23] L.M. Epple, R.D. Dodd, A.L. Merz, A.M. Dechkovskaia, M. Herring, B.A. Winston, A.M. Lencioni, R.L. Russell, H. Madsen, M. Nega, N.L. Dusto, J. White, D.D. Bigner, C. v. Nicchitta, N.J. Serkova, M.W. Graner, Induction of the Unfolded Protein Response Drives Enhanced Metabolism and Chemoresistance in Glioma Cells, *PLoS ONE*. 8 (2013) e73267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073267>.
- [24] A. Kyani, S. Tamura, S. Yang, A. Shergalis, S. Samanta, Y. Kuang, M. Ljungman, N. Neamati, Discovery and Mechanistic Elucidation of a Class of

- Protein Disulfide Isomerase Inhibitors for the Treatment of Glioblastoma, *ChemMedChem*. 13 (2018) 164–177. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700629>.
- [25] S. Xu, Y. Liu, K. Yang, H. Wang, A. Shergalis, A. Kyani, A. Bankhead, S. Tamura, S. Yang, X. Wang, C. Wang, A. Rehemtulla, M. Ljungman, N. Neamati, Inhibition of protein disulfide isomerase in glioblastoma causes marked downregulation of DNA repair and DNA damage response genes, *Theranostics*. 9 (2019) 2282–2298. <https://doi.org/10.7150/thno.30621>.
- [26] A. Almanza, A. Carlesso, C. Chintha, S. Creedican, D. Doultinos, B. Leuzzi, A. Luís, N. McCarthy, L. Montibeller, S. More, A. Papaioannou, F. Püschel, M.L. Sassano, J. Skoko, P. Agostinis, J. de Bellerocche, L.A. Eriksson, S. Fulda, A.M. Gorman, S. Healy, A. Kozlov, C. Muñoz-Pinedo, M. Rehm, E. Chevet, A. Samali, Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications, *The FEBS Journal*. 286 (2019) 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>.
- [27] S.-F. Tsai, M. Tao, L.-I. Ho, T.-W. Chiou, S.-Z. Lin, H.-L. Su, H.-J. Harn, Isochaihulactone-induced DDIT3 causes ER stress-PERK independent apoptosis in glioblastoma multiforme cells, *Oncotarget*. 8 (2017) 4051–4061. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13266>.
- [28] R. Bhattacharjee, A. Devi, S. Mishra, Molecular docking and molecular dynamics studies reveal structural basis of inhibition and selectivity of inhibitors EGCG and OSU-03012 toward glucose regulated protein-78 (GRP78) overexpressed in glioblastoma, *Journal of Molecular Modeling*. 21 (2015) 272. <https://doi.org/10.1007/s00894-015-2801-3>.
- [29] E. Xipell, T. Aragón, N. Martínez-Velez, B. Vera, M.A. Idoate, J.J. Martínez-Irujo, A.G. Garzón, M. Gonzalez-Huarriz, A.M. Acanda, C. Jones, F.F. Lang, J. Fueyo, C. Gomez-Manzano, M.M. Alonso, Endoplasmic reticulum stress-inducing drugs sensitize glioma cells to temozolomide through downregulation of MGMT, MPG, and Rad51, *Neuro-Oncology*. 18 (2016) 1109–1119. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now022>.
- [30] J.L. Weatherbee, J.-L. Kraus, A.H. Ross, ER stress in temozolomide-treated glioblastomas interferes with DNA repair and induces apoptosis, *Oncotarget*. 7 (2016) 43820–43834. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9907>.
- [31] L. Sansalone, E. Veliz, N. Myrthil, V. Stathias, W. Walters, I. Torrens, S. Schürer, S. Vanni, R. Leblanc, R. Graham, Novel Curcumin Inspired Bis-

- Chalcone Promotes Endoplasmic Reticulum Stress and Glioblastoma Neurosphere Cell Death, *Cancers (Basel)*. 11 (2019) 357. <https://doi.org/10.3390/cancers11030357>.
- [32] M.W. Graner, D.A. Raynes, D.D. Bigner, V. Guerriero, Heat shock protein 70-binding protein 1 is highly expressed in high-grade gliomas, interacts with multiple heat shock protein 70 family members, and specifically binds brain tumor cell surfaces, *Cancer Science*. 100 (2009) 1870–1879. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01269.x>.
- [33] M.W. Graner, R.I. Cumming, D.D. Bigner, The Heat Shock Response and Chaperones/Heat Shock Proteins in Brain Tumors: Surface Expression, Release, and Possible Immune Consequences, *Journal of Neuroscience*. 27 (2007) 11214–11227. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3588-07.2007>.
- [34] P. Pyrko, A.H. Schönthal, F.M. Hofman, T.C. Chen, A.S. Lee, The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas, *Cancer Research*. 67 (2007) 9809–9816. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0625>.
- [35] B. Drogat, P. Auguste, D.T. Nguyen, M. Bouche-careilh, R. Pineau, J. Nalbantoglu, R.J. Kaufman, E. Chevet, A. Bikfalvi, M. Moenner, IRE1 Signaling Is Essential for Ischemia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression and Contributes to Angiogenesis and Tumor Growth *In vivo*, *Cancer Research*. 67 (2007) 6700–6707. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3235>.
- [36] G. Auf, A. Jabouille, S. Guerit, R. Pineau, M. Delugin, M. Bouche-careilh, N. Magnin, A. Favereaux, M. Maitre, T. Gaiser, A. von Deimling, M. Czabanka, P. Vajkoczy, E. Chevet, A. Bikfalvi, M. Moenner, Inositol-requiring enzyme 1 is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107 (2010) 15553–15558. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914072107>.
- [37] S. Lhomond, T. Avril, N. Dejeans, K. Voutetakis, D. Doultinos, M. McMahon, R. Pineau, J. Obacz, O. Papadodima, F. Jouan, H. Bourien, M. Logotheti, G. Jégou, N. Pallares-Lupon, K. Schmit, P. le Reste, A. Etcheverry, J. Mosser, K. Barroso, E. Vauléon, M. Maurel, A. Samali, J.B. Patterson, O. Pluquet, C. Hetz, V. Quillien, A. Chatziioannou, E. Chevet, Dual IRE1 RNase functions dictate

- glioblastoma development, *EMBO Molecular Medicine*. 10 (2018). <https://doi.org/10.15252/emmm.201707929>.
- [38] O. Pluquet, N. Dejeans, M. Bouchecareilh, S. Lhomond, R. Pineau, A. Higa, M. Delugin, C. Combe, S. Lorient, G. Cubel, N. Dugot-Senant, A. Vital, H. Loiseau, S.J.C. Gosline, S. Taouji, M. Hallett, J.N. Sarkaria, K. Anderson, W. Wu, F.J. Rodriguez, J. Rosenbaum, F. Saltel, M.E. Fernandez-Zapico, E. Chevet, Posttranscriptional Regulation of *PER1* Underlies the Oncogenic Function of IRE α , *Cancer Research*. 73 (2013) 4732–4743. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3989>.
- [39] J. Obacz, T. Avril, P.-J. le Reste, H. Urra, V. Quillien, C. Hetz, E. Chevet, Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma—From molecular mechanisms to therapeutic perspectives, *Science Signaling*. 10 (2017). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aal2323>.
- [40] Z. Jiang, G. Zhang, L. Huang, Y. Yuan, C. Wu, Y. Li, Transmissible Endoplasmic Reticulum Stress: A Novel Perspective on Tumor Immunity, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00846>.
- [41] X. Chen, J.R. Cubillos-Ruiz, Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment, *Nature Reviews Cancer*. 21 (2021) 71–88. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00312-2>.
- [42] J. Obacz, T. Avril, C. Rubio-Patiño, J.P. Bossowski, A. Igarria, J.-E. Ricci, E. Chevet, Regulation of tumor-stroma interactions by the unfolded protein response, *The FEBS Journal*. 286 (2019) 279–296. <https://doi.org/10.1111/febs.14359>.
- [43] C. Neftel, J. Laffy, M.G. Filbin, T. Hara, M.E. Shore, G.J. Rahme, A.R. Richman, D. Silverbush, M.L. Shaw, C.M. Hebert, J. Dewitt, S. Gritsch, E.M. Perez, L.N. Gonzalez Castro, X. Lan, N. Druck, C. Rodman, D. Dionne, A. Kaplan, M.S. Bertalan, J. Small, K. Pelton, S. Becker, D. Bonal, Q.-D. Nguyen, R.L. Servis, J.M. Fung, R. Mylvaganam, L. Mayr, J. Gojo, C. Haberler, R. Geyeregger, T. Czech, I. Slavic, B. v. Nahed, W.T. Curry, B.S. Carter, H. Wakimoto, P.K. Brastianos, T.T. Batchelor, A. Stemmer-Rachamimov, M. Martinez-Lage, M.P. Frosch, I. Stamenkovic, N. Riggi, E. Rheinbay, M. Monje, O. Rozenblatt-Rosen, D.P. Cahill, A.P. Patel, T. Hunter, I.M. Verma, K.L. Ligon, D.N. Louis, A. Regev, B.E. Bernstein, I. Tirosh, M.L. Suvà, An Integrative Model of Cellular States,

- Plasticity, and Genetics for Glioblastoma, *Cell*. 178 (2019) 835-849.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>.
- [44] E. Cerami, J. Gao, U. Dogrusoz, B.E. Gross, S.O. Sumer, B.A. Aksoy, A. Jacobsen, C.J. Byrne, M.L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A.P. Goldberg, C. Sander, N. Schultz, The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data: Figure 1., *Cancer Discovery*. 2 (2012) 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>.
- [45] J. Gao, B.A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S.O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, E. Cerami, C. Sander, N. Schultz, Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal, *Science Signaling*. 6 (2013). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>.
- [46] S.-J. Park, B.-H. Yoon, S.-K. Kim, S.-Y. Kim, GENT2: an updated gene expression database for normal and tumor tissues, *BMC Medical Genomics*. 12 (2019) 101. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0514-7>.
- [47] Y. Hao, S. Hao, E. Andersen-Nissen, W.M. Mauck, S. Zheng, A. Butler, M.J. Lee, A.J. Wilk, C. Darby, M. Zager, P. Hoffman, M. Stoeckius, E. Papalexi, E.P. Mimitou, J. Jain, A. Srivastava, T. Stuart, L.M. Fleming, B. Yeung, A.J. Rogers, J.M. McElrath, C.A. Blish, R. Gottardo, P. Smibert, R. Satija, Integrated analysis of multimodal single-cell data, *Cell*. 184 (2021) 3573-3587.e29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.048>.
- [48] M.S. Kowalczyk, I. Tirosh, D. Heckl, T.N. Rao, A. Dixit, B.J. Haas, R.K. Schneider, A.J. Wagers, B.L. Ebert, A. Regev, Single-cell RNA-seq reveals changes in cell cycle and differentiation programs upon aging of hematopoietic stem cells, *Genome Research*. 25 (2015) 1860–1872. <https://doi.org/10.1101/gr.192237.115>.
- [49] S. Reich, C.D.L. Nguyen, C. Has, S. Steltgens, H. Soni, C. Coman, M. Freyberg, A. Bichler, N. Seifert, D. Conrad, C.B. Knobbe-Thomsen, B. Tews, G. Toedt, R. Ahrends, J. Medenbach, A multi-omics analysis reveals the unfolded protein response regulon and stress-induced resistance to folate-based antimetabolites, *Nature Communications*. 11 (2020) 2936. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16747-y>.

- [50] M.B. Pereira, L.R.C. Barros, P.A. Bracco, A. Vigo, M. Boroni, M.H. Bonamino, G. Lenz, Transcriptional characterization of immunological infiltrates and their relation with glioblastoma patients overall survival, *Oncolmmunology*. 7 (2018) e1431083. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1431083>.
- [51] P. Charoentong, F. Finotello, M. Angelova, C. Mayer, M. Efremova, D. Rieder, H. Hackl, Z. Trajanoski, Pan-cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade, *Cell Reports*. 18 (2017) 248–262. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.019>.
- [52] N. Dejeans, S. Manié, C. Hetz, F. Bard, T. Hupp, P. Agostinis, A. Samali, E. Chevet, Addicted to secrete – novel concepts and targets in cancer therapy, *Trends in Molecular Medicine*. 20 (2014) 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.12.003>.
- [53] N.M. Peñaranda Fajardo, C. Meijer, F.A.E. Kruyt, The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma, *Biochemical Pharmacology*. 118 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.04.008>.
- [54] Z. Zheng, G. Wang, L. Li, J. Tseng, F. Sun, X. Chen, L. Chang, H. Heng, K. Zhang, Transcriptional signatures of unfolded protein response implicate the limitation of animal models in pathophysiological studies, *Environmental Disease*. 1 (2016) 24. <https://doi.org/10.4103/2468-5690.180333>.
- [55] J. Hwang, L. Qi, Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways, *Trends in Biochemical Sciences*. 43 (2018) 593–605. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.005>.
- [56] H. Vanacker, J. Veters, L. Moudombi, C. Caux, S. Janssens, M.-C. Michallet, Emerging Role of the Unfolded Protein Response in Tumor Immunosurveillance, *Trends in Cancer*. 3 (2017) 491–505. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.05.005>.
- [57] I. Tirosh, M.L. Suvà, Dissecting human gliomas by single-cell RNA sequencing, *Neuro-Oncology*. 20 (2018) 37–43. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox126>.
- [58] M. Mellai, L. Annovazzi, R. Boldorini, L. Bertero, P. Cassoni, P. de Blasio, I. Biunno, D. Schiffer, SEL1L plays a major role in human malignant gliomas, *The Journal of Pathology: Clinical Research*. 6 (2020) 17–29. <https://doi.org/10.1002/cjp2.134>.

- [59] M. Cattaneo, S. Baronchelli, D. Schiffer, M. Mellai, V. Caldera, G.J. Saccani, L. Dalpra, A. Daga, R. Orlandi, P. DeBlasio, I. Biunno, Down-modulation of SEL1L, an Unfolded Protein Response and Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Protein, Sensitizes Glioma Stem Cells to the Cytotoxic Effect of Valproic Acid, *Journal of Biological Chemistry*. 289 (2014) 2826–2838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.527754>.
- [60] R. Orlandi, M. Cattaneo, F. Troglio, P. Casalini, C. Ronchini, S. Ménard, I. Biunno, SEL1L expression decreases breast tumor cell aggressiveness in vivo and in vitro., *Cancer Res*. 62 (2002) 567–74.
- [61] M. Cattaneo, S. Orlandini, S. Beghelli, P.S. Moore, C. Sorio, A. Bonora, C. Bassi, G. Talamini, G. Zamboni, R. Orlandi, S. Ménard, L.R. Bernardi, I. Biunno, A. Scarpa, SEL1L expression in pancreatic adenocarcinoma parallels SMAD4 expression and delays tumor growth in vitro and in vivo, *Oncogene*. 22 (2003) 6359–6368. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206665>.
- [62] Z. Li, M. Szabolcs, J.D. Terwilliger, A. Efstratiadis, Prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma in mice expressing a probasin- Neu oncogenic transgene, *Carcinogenesis*. 27 (2006) 1054–1067. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi324>.
- [63] S. Ferrero, M. Falleni, M. Cattaneo, G. Malferrari, C. Canton, L. Biagiotti, M. Maggioni, M. Nosotti, G. Coggi, S. Bosari, I. Biunno, SEL1L expression in non-small cell lung cancer, *Human Pathology*. 37 (2006) 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.12.012>.
- [64] S. Blancas, R. Medina-Berlanga, L. Ortíz-García, A. Loredó-Ramírez, L. Santos, Protein Expression Analysis in Uterine Cervical Cancer for Potential Targets in Treatment, *Pathology & Oncology Research*. 25 (2019) 493–501. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0401-0>.
- [65] M. Kappadakunnel, A. Eskin, J. Dong, S.F. Nelson, P.S. Mischel, L.M. Liau, P. Ngheimphu, A. Lai, T.F. Cloughesy, J. Goldin, W.B. Pope, Stem cell associated gene expression in glioblastoma multiforme: relationship to survival and the subventricular zone, *Journal of Neuro-Oncology*. 96 (2010) 359–367. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-9983-4>.
- [66] Y. Wang, W. Zhao, Z. Xiao, G. Guan, X. Liu, M. Zhuang, A risk signature with four autophagy-related genes for predicting survival of glioblastoma multiforme,

- Journal of Cellular and Molecular Medicine. 24 (2020) 3807–3821. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14938>.
- [67] H. Hu, M. Tian, C. Ding, S. Yu, The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection, *Frontiers in Immunology*. 9 (2019). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03083>.
- [68] K.M.A. Rouschop, T. van den Beucken, L. Dubois, H. Niessen, J. Bussink, K. Savelkouls, T. Keulers, H. Mujcic, W. Landuyt, J.W. Voncken, P. Lambin, A.J. van der Kogel, M. Koritzinsky, B.G. Wouters, The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5, *Journal of Clinical Investigation*. 120 (2010) 127–141. <https://doi.org/10.1172/JCI40027>.
- [69] W. B'chir, A.-C. Maurin, V. Carraro, J. Averous, C. Jousse, Y. Muranishi, L. Parry, G. Stepien, P. Fafournoux, A. Bruhat, The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression, *Nucleic Acids Research*. 41 (2013) 7683–7699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt563>.
- [70] Y. Shimodaira, S. Takahashi, Y. Kinouchi, K. Endo, H. Shiga, Y. Kakuta, M. Kuroha, T. Shimosegawa, Modulation of endoplasmic reticulum (ER) stress-induced autophagy by C/EBP homologous protein (CHOP) and inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) in human colon cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 445 (2014) 524–533. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.054>.
- [71] N. Ohoka, S. Yoshii, T. Hattori, K. Onozaki, H. Hayashi, TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4–CHOP pathway and is involved in cell death, *The EMBO Journal*. 24 (2005) 1243–1255. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600596>.
- [72] C.C. Wolford, S.J. McConoughey, S.P. Jalgaonkar, M. Leon, A.S. Merchant, J.L. Dominick, X. Yin, Y. Chang, E.J. Zmuda, S.A. O'Toole, E.K.A. Millar, S.L. Roller, C.L. Shapiro, M.C. Ostrowski, R.L. Sutherland, T. Hai, Transcription factor ATF3 links host adaptive response to breast cancer metastasis, *Journal of Clinical Investigation*. 123 (2013) 2893–2906. <https://doi.org/10.1172/JCI64410>.

- [73] H.-C. Ku, C.-F. Cheng, Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer, *Frontiers in Endocrinology*. 11 (2020). <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00556>.
- [74] T.K. Sears, J.M. Angelastro, The transcription factor ATF5: role in cellular differentiation, stress responses, and cancer, *Oncotarget*. 8 (2017) 84595–84609. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21102>.
- [75] J. Humeau, L. Bezu, O. Kepp, G. Kroemer, EIF2 α phosphorylation: a hallmark of both autophagy and immunogenic cell death, *Molecular & Cellular Oncology*. 7 (2020) 1776570. <https://doi.org/10.1080/23723556.2020.1776570>.
- [76] M. Schmitz, M. Shaban, B. Albert, A. Gökçen, M. Kracht, The Crosstalk of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Pathways with NF- κ B: Complex Mechanisms Relevant for Cancer, Inflammation and Infection, *Biomedicines*. 6 (2018) 58. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020058>.
- [77] C. Rubio-Patiño, J.P. Bossowski, E. Chevet, J.-E. Ricci, Reshaping the Immune Tumor Microenvironment Through IRE1 Signaling, *Trends in Molecular Medicine*. 24 (2018) 607–614. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.05.005>.
- [78] J.-S. So, Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses., *Mol Cells*. 41 (2018) 705–716. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0241>.
- [79] J.R. Cubillos-Ruiz, E. Mohamed, P.C. Rodriguez, Unfolding anti-tumor immunity: ER stress responses sculpt tolerogenic myeloid cells in cancer, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 5 (2017) 5. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0203-4>.

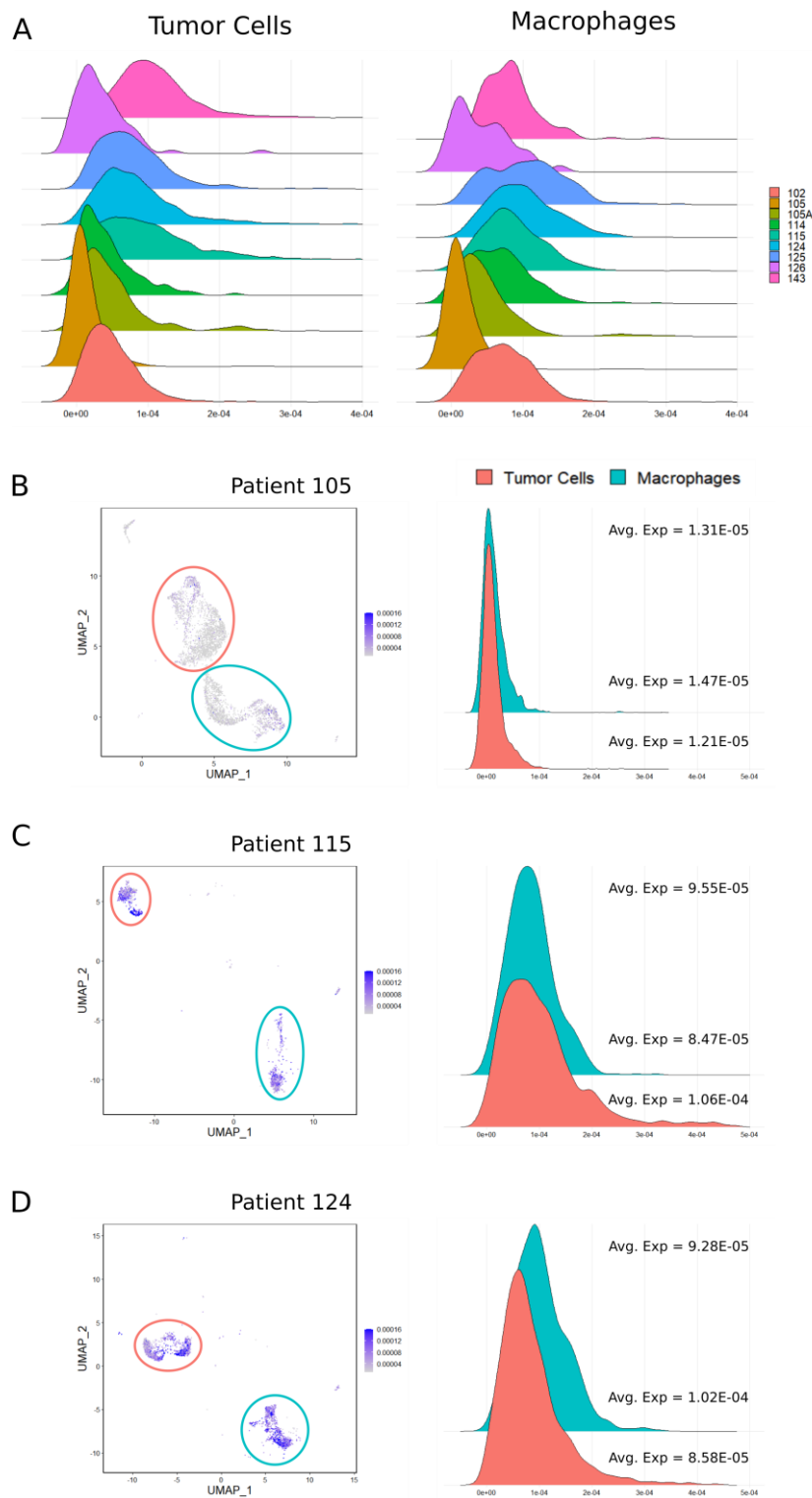


Figure S2. ER stress expression comparison between tumor and macrophage populations. (A) Ridge plots of ER stress signature expression of each patient, divided into tumor and macrophage populations. (B-D) Feature and ridge plots depicting expression of ER stress gene signature in tumor and macrophage populations of three patients: 105 has low expression in both populations (B), 115 has high expression and mainly in tumor cells (C), and 125 also has high expression but mainly in macrophages (D). Average signature expression is shown for the two populations of each patient.

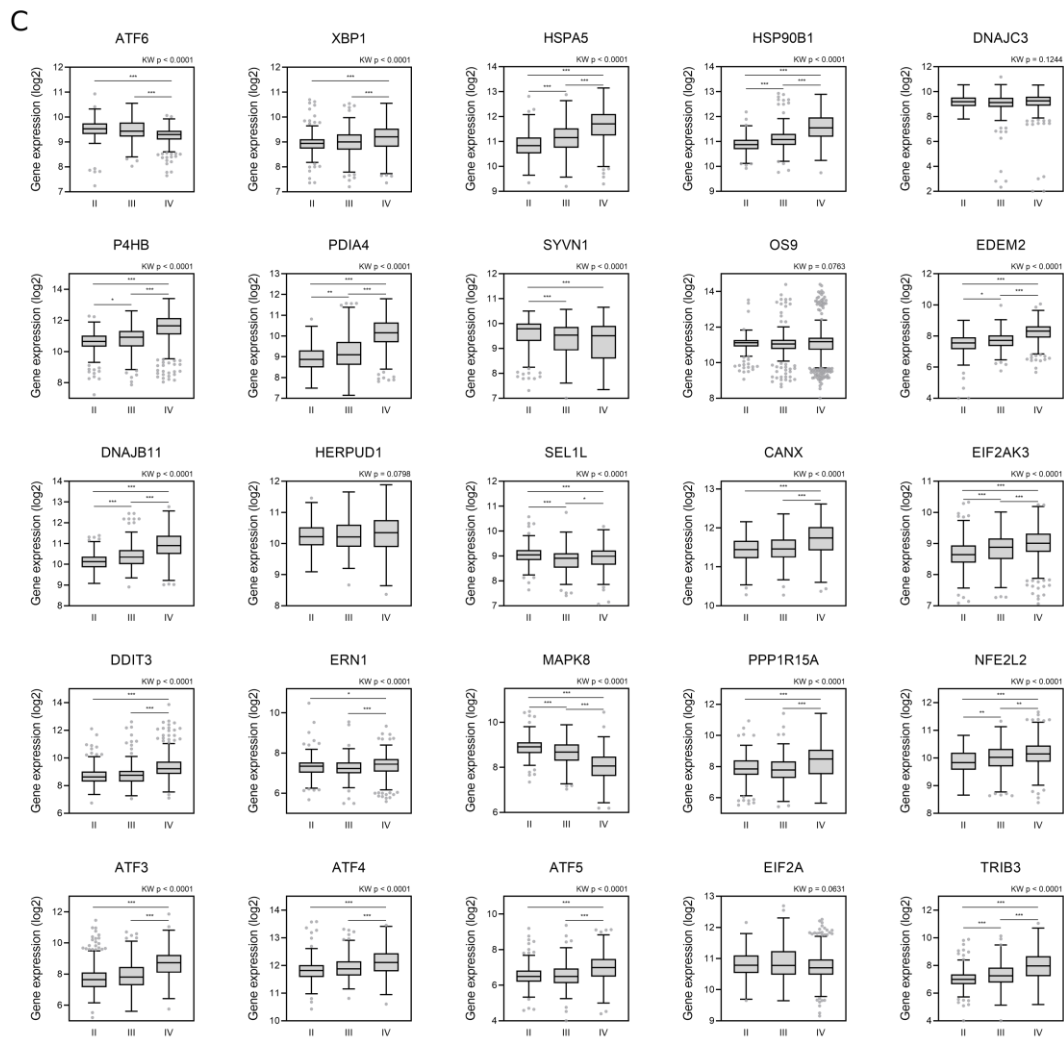
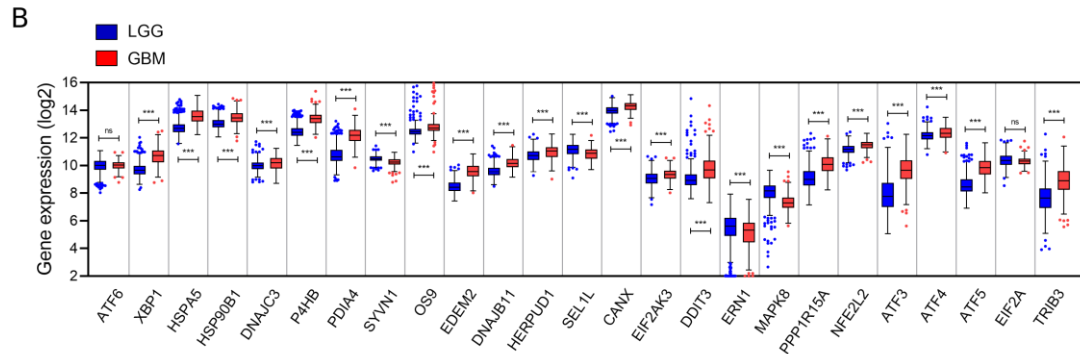
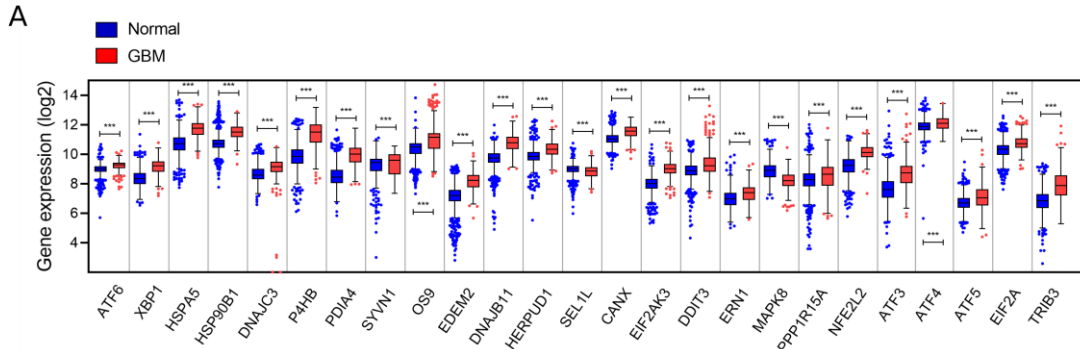


Figure S3. Differential expression analysis of 25 UPR genes. (A) Mann-Whitney U test was carried out comparing microarray expression data of 844 normal brain tissue samples and 408 GBM tumor samples obtained from GEO Platform GPL570. (B) Mann-Whitney U test was carried out comparing RNA-seq data of 514 low-grade glioma (LGG) samples and 160 GBM samples obtained from TCGA cohort. (C) Kruskal Wallis test was carried out comparing microarray data across grade II, III and IV glioma samples obtained from GEO Platform GPL570. Kruskal Wallis p values are indicated, and Dunn's test was performed for multiple comparisons. Horizontal lines indicate median; box lines indicate first & third quartiles.

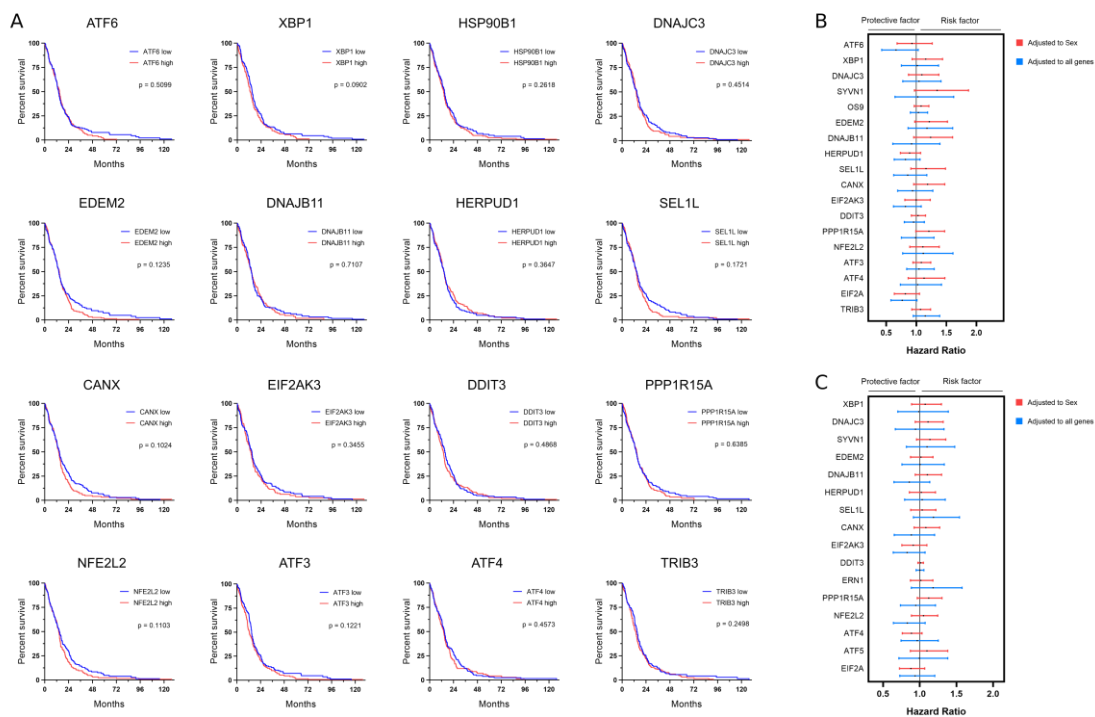


Figure S4. Impact of individual UPR genes on patient survival. (A) Kaplan-Meier plots of the 16 UPR genes that showed no significant impact on survival using microarray data from the TCGA cohort. Log-rank p values are indicated. Cox proportional hazard ratio of genes with no significant impact adjusted only to the clinical variable Sex (in red) and adjusted to Sex and all other genes (in blue) using (B) microarray data and (C) RNA-seq data from TCGA cohorts.

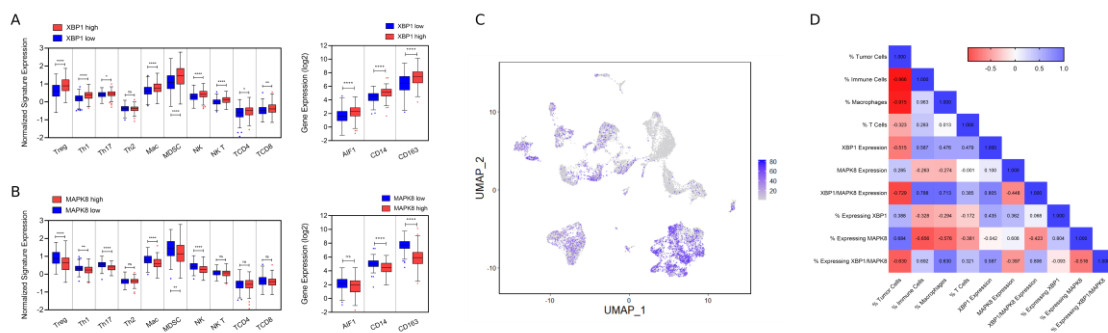


Figure S5. Expression of immune cell signatures and immune markers in *XBP1* low and *XBP1* high expression groups (A) and in *MAPK8* low and high expression groups (B). Mann-Whitney U test was carried out comparing microarray expression data from the TCGA cohort. (C) Feature plot depicting *XBP1/MAPK8* expression ratio in single cells of the 9 glioblastomas from scRNA-seq data. (D) Correlation matrix between percentages of cell types and *XBP1* and *MAPK8* expression parameters, using scRNA-seq data. The number in each cell represents the value of Pearson's correlation coefficient. Cell color indicates correlation (red, negative correlation; blue, positive correlation).

Supplementary Table Legends

Table S1. Clinical information of glioblastomas from the scRNA-seq dataset.

Table S2. Clinical information of patient samples from The Cancer Genome Atlas Firehose Legacy and PanCancer Atlas datasets.

Table S3. Description of the GEO series from GEO Platform GPL570 used for differential expression analysis.

Table S4. Description of the GEO series used for meta-signature validation.

Table S5. ER stress signature gene list.

Table S6. Percentages of cell types and ER stress signature and individual genes expression parameters of each patient from scRNA-seq data.

Table S7. Hazard ratio values and statistical information from Cox proportional analysis.

4. DISCUSSÃO

A resposta a proteínas mal enoveladas tem sido intensamente estudada no contexto do câncer nas últimas décadas, e cada vez mais trabalhos evidenciam um papel relevante dessa via no desenvolvimento e na progressão tumorais, inclusive apontando a UPR como um potencial alvo terapêutico em diferentes tipos de câncer. Considerando que glioblastoma é uma doença com um prognóstico ainda muito desfavorável e que a modulação da UPR vem surgindo como uma estratégia promissora nesse tumor em combinação aos tratamentos já utilizados, nosso trabalho teve como foco a caracterização dos genes da UPR em pacientes com GBM. Nós exploramos dados de expressão gênica populacionais e de *single-cell* com o objetivo de avaliar o perfil transcricional da UPR em amostras de pacientes e contribuir para um melhor entendimento do papel dessa via na progressão do GBM.

Primeiramente, nós avaliamos a expressão de genes associados ao estresse do RE no microambiente tumoral. Estudos anteriores mostraram que células não-malignas do microambiente também apresentam ativação da sinalização da UPR, que por sua vez modula programas transcricionais específicos nessas células. Além disso, a UPR modula as interações tumor-estroma através da regulação da expressão de citocinas tanto nas células tumorais quanto nas células do microambiente (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021; OBACZ *et al.*, 2019; ZANETTI *et al.*, 2022). Sendo assim, nós exploramos dados já publicados de scRNA-seq para distinguir células malignas de não-malignas e construímos uma meta-assinatura de genes induzidos sob estresse do RE para acessar de forma geral a ativação da UPR entre tipos celulares e pacientes com os dados de scRNA-seq. A meta-assinatura foi criada a partir de perfis transcricionais de células de glioma tratadas com dois indutores clássicos de estresse do RE, tunicamicina e taspigargina, (REICH *et al.*, 2020) e foi validada em outros quatro conjuntos de dados. Conforme esperado, a assinatura gênica foi expressa tanto nas populações malignas (células tumorais) quanto nas não-malignas (células T, macrófagos e oligodendrócitos). Da mesma forma, quatro genes individuais representativos (*XBP1*, *HERPUD1*, *P4HB* e *HSPA5*), que são componentes conhecidos da UPR e são regulados positivamente sob estresse do retículo, também apresentaram sua expressão distribuída nos quatro tipos celulares, embora tenha sido possível observar diferenças gene-específicas no padrão de expressão.

A expressão da meta-assinatura de estresse e dos genes individuais variou consideravelmente entre pacientes. Contudo, dentro do mesmo paciente, os diferentes tipos celulares possuíram um padrão de expressão semelhante: pacientes com alta expressão da assinatura nas células tumorais apresentaram também uma elevada expressão nas células imunes, enquanto pacientes com baixa expressão nas células tumorais também exibiram baixa expressão nas células imunes. Isso pode ser uma consequência do processamento diferencial das amostras, embora etapas de normalização tenham sido realizadas para minimizar esses efeitos. Porém, o mais interessante desses resultados foi a heterogeneidade intratumoral observada, visto que cada paciente apresentou subpopulações de células com padrões de expressão distintos. Isso indica que populações de células dentro do mesmo tumor podem apresentar diferentes níveis de ativação da UPR. Esse resultado é extremamente relevante considerando que a UPR já foi associada com características malignas do tumor, como resistência à terapia, angiogênese e infiltração imune (OAKES, 2020). Investigações mais aprofundadas dessas populações com alta ativação da UPR dentro de um mesmo tumor podem gerar uma melhor compreensão dos mecanismos por trás do papel da UPR em processos tumorais importantes, especialmente na resistência à terapia, e assim possibilitar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem essas subpopulações através da modulação dessa via.

Posteriormente, analisando dados de expressão gênica populacionais, nós encontramos a grande maioria dos genes envolvidos na UPR aumentada em amostras de GBM em comparação com tecidos de cérebro normal, e esse resultado se manteve quando comparamos com amostras de gliomas de baixo grau (LGG, do inglês *low-grade glioma*). Em geral, a expressão desses genes também se correlacionou positivamente com o grau do tumor, aumentando significativamente de gliomas grau II para grau III e, especialmente, grau IV. Também com dados de RNA-seq e microarranjo populacionais, nós realizamos análises de sobrevida através de curvas Kaplan-Meier e regressão de Cox. Considerando genes que obtiveram significância em ambos os métodos utilizados, nós identificamos cinco fatores de risco e dois fatores de proteção. A superexpressão e a relevância prognóstica de alguns desses genes, como *HSPA5* e a família PDI, já haviam sido relatadas em modelos de GBM (EPPLÉ *et al.*, 2013; KYANI *et al.*, 2018), embora poucos estudos houvessem reportado esses resultados em amostras de pacientes. A esses fatores já bem conhecidos, adicionamos outros genes relevantes não tão investigados no contexto

do GBM, como a chaperona *HSP90B1*, os componentes de ERAD *OS9* e *SYVN1*, e os membros da via PERK *ATF3* e *ATF5*.

Os resultados das análises de expressão diferencial e de sobrevida corroboram com estudos anteriores que já haviam reportado uma elevada ativação da UPR e um aumento nos níveis de chaperonas do RE em modelos *in vitro* e *in vivo* de GBM (EPPLÉ *et al.*, 2013; FATHALLAH-SHAYKH, 2005; GRANER *et al.*, 2009; GRANER; CUMMING; BIGNER, 2007; PEÑARANDA FAJARDO; MEIJER; KRUYT, 2016; PYRKO *et al.*, 2007). A maioria dos genes que foram encontrados aumentados em GBM em comparação a tecidos de cérebro normal e a amostras de LGG codificam proteínas envolvidas no enovelamento proteico e na degradação de proteínas mal dobradas, e são fundamentais para a adaptação da célula ao estresse. Esses genes incluem: *HSPA5* e *HSP90B1* (chaperonas do RE); *DNAJC3* e *DNAJB11* (co-chaperonas); *P4HB* e *PDIA4* (subunidades da proteína dissulfeto isomerase); *CANX* (envolvida no enovelamento de proteínas recém-sintetizadas); e *EDEM2*, *HERPUD1* e *OS9* (componentes de ERAD). Além disso, dos cinco fatores de risco identificados por ambas as análises de sobrevida, quatro são genes envolvidos no enovelamento e na degradação proteicos (*HSPA5*, *P4HB*, *PDIA4* e *OS9*). Isso vai ao encontro da visão de que a UPR é ativada nas células tumorais em resposta aos estresses intrínsecos e extrínsecos e que suas vias adaptativas assistem o crescimento do tumor promovendo a adaptação das células tumorais às condições estressantes do microambiente tumoral (OAKES, 2020).

Embora a maioria dos genes das vias adaptativas da UPR, envolvidos no enovelamento e na degradação proteicos, seguiram o padrão mencionado acima, alguns genes tiveram comportamentos discrepantes. O gene *SEL1L*, cujo produto é um componente do sistema de ERAD e se associa com HRD1 (*SVYN1*) e *OS9* para realizar a translocação de proteínas mal dobradas para o citosol, teve sua expressão diminuída em GBM em comparação tanto com tecido cerebral normal quanto com amostras de LGG. Esse gene parece apresentar funções oncogênicas ou supressoras tumorais dependendo da predominância de suas diferente isoformas proteicas e da localização celular dessas proteínas, e seus níveis proteicos já foram encontrados tanto aumentados quanto diminuídos em diferentes tipos de câncer (MELLAI *et al.*, 2020). Visto que os métodos de microarranjo e RNA-seq utilizados só permitem o acesso aos níveis totais de transcritos na população, são necessárias ferramentas transcriptômicas e proteômicas que possibilitem a diferenciação entre as isoformas e

suas localizações celulares de modo a facilitar a compreensão da função de *SEL1L* em GBM. O gene *SYVN1*, cuja proteína HRD1 participa de ERAD juntamente de *SEL1L*, também apresentou resultados contrastantes. Enquanto sua expressão foi encontrada significativamente aumentada em GBM em relação aos tecidos cerebrais normais, seus níveis estavam diminuídos quando comparados com LGG. Em contrapartida, sua expressão foi associada com um pior prognóstico por meio das curvas Kaplan-Meier, embora ele não tenha sido identificado como fator de risco na análise de Cox. Apesar de ainda haver poucos estudos sobre o impacto de *SYVN1* em câncer, trabalhos recentes reportaram que a proteína HRD1 atua como supressor tumoral em câncer de mama, mas está envolvida na progressão tumoral em cânceres de fígado, cólon e pulmão (FAN *et al.*, 2021; JI *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2020; TAN; HE; FAN, 2019). Dessa forma, mais investigações são necessárias para entender o impacto de *SYVN1* em GBM.

Além desses dois componentes de ERAD, *ATF6* também apresentou um comportamento destoante. Esse gene, cujo produto é um dos fatores de transcrição mais importantes da UPR, foi encontrado aumentado em GBM quando comparado com tecido normal ao mesmo tempo que teve sua expressão diminuída em relação a gliomas de grau II e III. Além disso, *ATF6* foi identificado como fator de proteção pela análise de Cox, embora seu alvo transcricional mais conhecido, a chaperona GRP78 (*HSPA5*), seja um conhecido fator de risco em GBM e outros cânceres. Essa discrepância entre os resultados de *ATF6* e seu alvo *HSPA5* podem ser devido a nossos métodos não nos permitirem avaliar integralmente a ativação de *ATF6*, que ocorre por meio da clivagem proteica no complexo de Golgi, o que impede uma avaliação direta do impacto desse gene na sobrevida. Apesar das limitações das nossas análises, isso não exclui a possibilidade de que *ATF6* tenha um impacto positivo na sobrevida em GBM e possa apresentar funções supressoras tumorais apesar de seus principais alvos serem fatores de risco. Os resultados deste trabalho mostram como *ATF6*, o sensor do estresse do RE menos estudado, pode ter funções complexas no câncer e deve ser melhor investigado.

Com respeito a via mediada por PERK, nossos resultados corroboram trabalhos anteriores que mostraram a ativação de PERK e de seu alvo eIF2 α , bem como o aumento nos níveis dos fatores de transcrição CHOP e ATF4, em modelos de GBM (EPPLE *et al.*, 2013; HOU *et al.*, 2015). Os genes envolvidos nessa via que foram analisados neste trabalho incluem: *EIF2AK3* (PERK); seu principal alvo *EIF2A*;

os fatores de transcrição *DDIT3* (CHOP), *ATF4*, *ATF3*, *ATF5* e *NFE2L2* (NRF2); e *PPP1R15A* (GADD34) e *TRIB3*, ambos ativados pela via ATF4/CHOP. Todos esses genes foram encontrados aumentados em GBM em comparação a tecidos de cérebro normais, confirmando uma elevada ativação dessa via da UPR em amostras de pacientes com GBM. Quanto às análises de sobrevivência, nossos resultados refletem a complexidade dessa via, que regula uma rede de fatores tanto citoprotetores quanto pró-apoptóticos e controla esse intrincado equilíbrio entre desfechos celulares opostos. Enquanto o fator pró-apoptótico *TRIB3* foi identificado como fator de proteção pela análise de Cox, *ATF3* e *ATF5*, ambos também alvos de ATF4 e CHOP, foram identificados como fatores de risco. Esses dois fatores de transcrição são reguladores da diferenciação celular e do metabolismo e são importantes pivôs da rede de respostas adaptativas a estresses na célula, sendo que ambos já foram implicados no desenvolvimento e na progressão de diversos tipos de câncer (KU; CHENG, 2020; SEARS; ANGELASTRO, 2017).

Por fim, a expressão de *EIF2A*, o principal alvo de PERK, foi associada a um melhor prognóstico em GBM por meio da curva Kaplan-Meier. Diferentes vias de resposta a estresses intrínsecos e extrínsecos convergem na fosforilação de eIF2 α , o que é chamado de resposta integrada ao estresse. Esse evento de fosforilação não só desencadeia a atenuação da tradução geral e a indução da via ATF4/CHOP, mas também provoca a ativação de outras vias e processos celulares importantes como autofagia e morte celular imunogênica. Os níveis de eIF2 α fosforilado já foram reportados como indicadores de um melhor prognóstico em diferentes tipos de câncer, o que suporta o resultado encontrado nesse trabalho. No entanto, é importante considerar que nossos métodos não nos permitem avaliar a fosforilação de eIF2 α , e sim os níveis de expressão do gene.

Finalmente, a terceira via da UPR, iniciada por IRE1 (*ERN1*), foi a via que mais aprofundamos nossas investigações neste trabalho. XBP1, um dos fatores de transcrição da UPR, é ativado por IRE1 através de um evento de *splicing* não-convencional. A expressão de *XBP1* foi encontrada aumentada em GBM em comparação a tecidos normais e amostras de LGG, além de ter apresentado correlação positiva com o grau do glioma, o que vai ao encontro de estudos anteriores em outros modelos de GBM (EPPLÉ *et al.*, 2013). Apesar de genes-alvo de XBP1, como *HSPA5* e *OS9*, terem sido identificados como fatores de risco, a expressão de

XBP1 não impactou significativamente o prognóstico dos pacientes em nenhuma das análises de sobrevida.

Por outro lado, sob estresse do RE, IRE1 também participa da ativação da proteína JNK (*MAPK8*), que é um dos principais fatores envolvidos na indução de apoptose mediada pela UPR. Consistente com seu papel na morte celular programada, *MAPK8* teve sua expressão diminuída em GBM em relação a amostras de tecido normal e de LGG, além de ter apresentado forte correlação negativa com o grau do glioma. Estudos prévios já haviam constatado o impacto desse gene no prognóstico de GBM e propuseram que isso se deve à função de *MAPK8* na morte celular (WANG *et al.*, 2020). Neste trabalho, tivemos resultados semelhantes, visto que *MAPK8* foi identificado como fator de proteção em ambas as análises de sobrevida. *ERN1* (IRE1), por sua vez, exibiu um comportamento ambíguo, já que foi encontrado aumentado em GBM comparado a tecidos cerebrais normais, mas sua expressão diminuiu em relação a amostras de LGG. Além disso, *ERN1* foi identificado como fator de proteção por ambos os métodos de análise de sobrevida, contradizendo trabalhos anteriores que o apontaram como fator de risco em pacientes com GBM (LHOMOND *et al.*, 2018). Contudo, *ERN1* não foi identificado como um fator prognóstico na análise de Cox quando foi ajustado pelo impacto do gene *MAPK8*, sugerindo que sua relevância na sobrevida aqui observada é dependente da função supressora tumoral de *MAPK8*.

Seguindo as investigações a respeito da via mediada por IRE1, que por um lado leva à indução de apoptose através de JNK e por outro desencadeia respostas adaptativas através de *XBP1*, nós analisamos o impacto dos dois genes na sobrevida dos pacientes através de curvas Kaplan-Meier. Conforme esperado, pacientes com alta expressão de *XBP1* e baixa expressão de *MAPK8* possuíram uma sobrevida significativamente menor que pacientes com baixa expressão de *XBP1* e alta expressão de *MAPK8*, confirmando que as vias a jusante de IRE1 possuem funções antagônicas no prognóstico de pacientes com GBM. A seguir, investigamos o impacto de *XBP1* e *MAPK8* na infiltração imune. Embora muitos dos mecanismos por trás da associação entre as vias a jusante de IRE1 e a infiltração imune ainda não são conhecidos, se sabe que IRE1 está envolvido na interação tumor-estroma através do processo de estresse do retículo transmissível e da regulação da expressão de citocinas tanto nas células tumorais quanto nas células imunes (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021; JIANG *et al.*, 2020; RUBIO-PATIÑO *et al.*, 2018). Primeiramente, com

dados populacionais, observamos uma elevada expressão de marcadores imunes no grupo de pacientes com expressão *XBP1+/MAPK8-* comparado ao grupo *XBP1-/MAPK8+*. Além disso, a expressão de meta-assinaturas de células imunes que haviam sido previamente relacionadas com um pior prognóstico em GBM, como macrófagos e células T regulatórias (PEREIRA *et al.*, 2018), também estava aumentada nesse grupo de pacientes, sugerindo uma maior infiltração desses tipos celulares nos pacientes com esse perfil de expressão.

Como utilizamos dados de expressão gênica populacionais, os resultados observados poderiam ser devido à expressão intrínseca desses genes nas células imunes, e não devido a um aumento na infiltração dessas células no tumor. Sendo assim, exploramos os dados de *single-cell*, e constatamos haver uma alta expressão especialmente de *XBP1* nas células imunes, sobretudo em macrófagos, o que já era esperado conforme estudos prévios (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021; RUBIO-PATIÑO *et al.*, 2018). Sendo assim, para investigar se a ativação das vias a jusante de IRE1 nas células malignas está relacionada com a infiltração imune, como já foi proposto em outros trabalhos (LHOMOND *et al.*, 2018), nós avaliamos a correlação da razão entre a expressão de *XBP1* e *MAPK8* apenas nas células tumorais com a porcentagem de células imunes em cada tumor. Nós observamos uma forte correlação positiva entre esses dois parâmetros, indicando um papel significativo dessas vias na infiltração imune. Entretanto, é importante considerar as limitações dessas análises, uma vez que analisamos apenas nove amostras de pacientes, além de que através dos métodos transcriptômicos utilizados não somos capazes de acessar os níveis de *splicing* do RNAm de *XBP1* nem de fosforilação de JNK, mas somente seus níveis totais de expressão gênica. Dessa forma, mais trabalhos são necessários para confirmar esses resultados e para desvendar os mecanismos pelos quais isso ocorre.

Em suma, este trabalho apresentou uma caracterização abrangente da resposta a proteínas mal enoveladas em pacientes com glioblastoma. Nossas análises mostraram que a expressão dos genes associados ao estresse do RE possui alta heterogeneidade intra e intertumoral e que a UPR é altamente expressa nas amostras de pacientes com GBM. Por fim, nós identificamos novos fatores de risco e proteção com potencial diagnóstico e terapêutico e sugerimos uma associação entre a expressão de dois componentes da UPR com a infiltração imune. Para além da caracterização geral da UPR em pacientes com GBM realizada nesse trabalho, a

abordagem e os dados transcriptômicos utilizados aqui possibilitam outras investigações mais aprofundadas da UPR em GBM. A interação da UPR com outros processos celulares, como autofagia, apoptose e inflamação, tanto nas células tumorais como nas células do microambiente também pode ser estudada por meio da exploração de dados de expressão gênica populacionais e, especialmente, de *single-cell*, visando uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais a UPR atua na progressão tumoral.

5. REFERÊNCIAS DO TEXTO PRINCIPAL

ALMANZA, A. *et al.* Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 286, n. 2, p. 241–278, 2019.

AUF, G. *et al.* Inositol-requiring enzyme 1 is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 107, n. 35, p. 15553–15558, 2010.

CALFON, M. *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. **Nature**, [s. l.], v. 415, n. 6867, p. 92–96, 2002.

CHEN, X.; CUBILLOS-RUIZ, J. R. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 71–88, 2021.

CULLINAN, S. B. *et al.* Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 23, n. 20, p. 7198–7209, 2003.

DROGAT, B. *et al.* IRE1 Signaling Is Essential for Ischemia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression and Contributes to Angiogenesis and Tumor Growth *In vivo*. **Cancer Research**, [s. l.], v. 67, n. 14, p. 6700–6707, 2007.

EPPLE, L. M. *et al.* Induction of the Unfolded Protein Response Drives Enhanced Metabolism and Chemoresistance in Glioma Cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. e73267, 2013.

FAN, Y. *et al.* CircNR3C2 promotes HRD1-mediated tumor-suppressive effect via sponging miR-513a-3p in triple-negative breast cancer. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 25, 2021.

FATHALLAH-SHAYKH, H. M. Genomic Discovery Reveals a Molecular System for Resistance to Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in Cultured Glioma. **Archives of Neurology**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 233, 2005.

GRANER, M. W. *et al.* Heat shock protein 70-binding protein 1 is highly expressed in high-grade gliomas, interacts with multiple heat shock protein 70 family members, and specifically binds brain tumor cell surfaces. **Cancer Science**, [s. l.], v. 100, n. 10, p. 1870–1879, 2009.

GRANER, M. W.; CUMMING, R. I.; BIGNER, D. D. The Heat Shock Response and Chaperones/Heat Shock Proteins in Brain Tumors: Surface Expression, Release, and Possible Immune Consequences. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 27, n. 42, p. 11214–11227, 2007.

HARDING, H. P. *et al.* Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 1099–1108, 2000.

HAZE, K. *et al.* Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 3787–3799, 1999.

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 89–102, 2012.

HETZ, C.; PAPA, F. R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 169–181, 2018.

HETZ, C.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 421–438, 2020.

HOMBACH-KLONISCH, S. *et al.* Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 184, p. 13–41, 2018.

HOU, X. *et al.* PERK silence inhibits glioma cell growth under low glucose stress by blockage of p-AKT and subsequent HK2's mitochondria translocation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 9065, 2015.

IURLARO, R.; MUÑOZ-PINEDO, C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 283, n. 14, p. 2640–2652, 2016.

JI, F. *et al.* Integrative proteomics reveals the role of E3 ubiquitin ligase SYVN1 in hepatocellular carcinoma metastasis. **Cancer Communications**, [s. l.], v. 41, n. 10, p. 1007–1023, 2021.

JIANG, Z. *et al.* Transmissible Endoplasmic Reticulum Stress: A Novel Perspective on Tumor Immunity. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 8, 2020.

KU, H.-C.; CHENG, C.-F. Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 11, 2020.

KYANI, A. *et al.* Discovery and Mechanistic Elucidation of a Class of Protein Disulfide Isomerase Inhibitors for the Treatment of Glioblastoma. **ChemMedChem**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 164–177, 2018.

LHOMOND, S. *et al.* Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development. **EMBO Molecular Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 3, 2018.

LI, X.; WANG, C.-Y. From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing. **International Journal of Oral Science**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 36, 2021.

LIU, L. *et al.* E3 Ubiquitin Ligase HRD1 Promotes Lung Tumorigenesis by Promoting Sirtuin 2 Ubiquitination and Degradation. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 40, n. 7, 2020.

MADDEN, E. *et al.* The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. **Biology of the cell**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 1–17, 2019.

MARKOULI, M. *et al.* Targeting of endoplasmic reticulum (ER) stress in gliomas. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 157, p. 104823, 2020.

MAUREL, M. *et al.* Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 245–254, 2014.

MELLAI, M. *et al.* SEL1L plays a major role in human malignant gliomas. **The Journal of Pathology: Clinical Research**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 17–29, 2020.

OAKES, S. A. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. **The American journal of pathology**, [s. l.], v. 190, n. 5, p. 934–946, 2020.

OBACZ, J. *et al.* Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma—From molecular mechanisms to therapeutic perspectives. **Science Signaling**, [s. l.], v. 10, n. 470, 2017.

OBACZ, J. *et al.* Regulation of tumor-stroma interactions by the unfolded protein response. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 286, n. 2, p. 279–296, 2019.

OSTROM, Q. T. *et al.* The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 896–913, 2014.

PALLUD, J. *et al.* Long-term results of carmustine wafer implantation for newly diagnosed glioblastomas: a controlled propensity-matched analysis of a French multicenter cohort. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 1609–1619, 2015.

PEÑARANDA FAJARDO, N. M.; MEIJER, C.; KRUYT, F. A. E. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 118, p. 1–8, 2016.

PEREIRA, M. B. *et al.* Transcriptional characterization of immunological infiltrates and their relation with glioblastoma patients overall survival. **Oncolmunology**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. e1431083, 2018.

PLUQUET, O. *et al.* Posttranscriptional Regulation of *PER1* Underlies the Oncogenic Function of IRE α . **Cancer Research**, [s. l.], v. 73, n. 15, p. 4732–4743, 2013.

PYRKO, P. *et al.* The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas. **Cancer Research**, [s. l.], v. 67, n. 20, p. 9809–9816, 2007.

READ, A.; SCHRÖDER, M. The Unfolded Protein Response: An Overview. **Biology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 384, 2021.

REICH, S. *et al.* A multi-omics analysis reveals the unfolded protein response regulon and stress-induced resistance to folate-based antimetabolites. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 2936, 2020.

RUBIO-PATIÑO, C. *et al.* Reshaping the Immune Tumor Microenvironment Through IRE1 Signaling. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 607–614, 2018.

SEARS, T. K.; ANGELASTRO, J. M. The transcription factor ATF5: role in cellular differentiation, stress responses, and cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 48, p. 84595–84609, 2017.

STUPP, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 352, n. 10, p. 987–996, 2005.

TAN, X.; HE, X.; FAN, Z. Upregulation of HRD1 promotes cell migration and invasion in colon cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 454, n. 1–2, p. 1–9, 2019.

TSAI, Y. C.; WEISSMAN, A. M. The Unfolded Protein Response, Degradation from the Endoplasmic Reticulum, and Cancer. **Genes & Cancer**, [s. l.], v. 1, n. 7, p. 764–778, 2010.

URANO, F. *et al.* Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. **Science**, [s. l.], v. 287, n. 5453, p. 664–666, 2000.

WANG, Y. *et al.* A risk signature with four autophagy-related genes for predicting survival of glioblastoma multiforme. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 3807–3821, 2020.

WEATHERBEE, J. L.; KRAUS, J.-L.; ROSS, A. H. ER stress in temozolomide-treated glioblastomas interferes with DNA repair and induces apoptosis. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 28, p. 43820–43834, 2016.

XIPELL, E. *et al.* Endoplasmic reticulum stress-inducing drugs sensitize glioma cells to temozolomide through downregulation of MGMT, MPG, and Rad51. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1109–1119, 2016.

XU, S. *et al.* Inhibition of protein disulfide isomerase in glioblastoma causes marked downregulation of DNA repair and DNA damage response genes. **Theranostics**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 2282–2298, 2019.

YAMAMOTO, K. *et al.* Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 α and XBP1. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 365–376, 2007.

ZANETTI, M. *et al.* The Unfolded Protein Response at the Tumor-Immune Interface. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, 2022.