

Hasnyálmirigy daganatok új célzott terápiás lehetőségeinek vizsgálata a tumor – stróma interakció mechanizmusainak tanulmányozásával

Doktori tézisek

Djurec Magdolna

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Kopper László Ph.D., DSc., professor emeritus

Hivatalos Bírálók: Dr. Buzás Krisztina, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Wiener Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Schaff Zsuzsa, Ph.D., DSc.,

MTA rendes tagja, professor emerita

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest

2018

Bevezetés

A pancreas daganatok legnagyobb részét a ductalis adenocarcinoma (PDAC) alkotja, amely az egyik legmagasabb halálozási arányt okozó daganattípus, az ötéves túlélés kevesebb, mint 6%. Ennek hátterében a tumor rendkívüli agresszivitása, a szegényes klinikai kórkép miatti késői felismerés és a komplikált, sok esetben sikertelen sebészeti beavatkozás áll. Ezen felül a betegek nagy része a posztoperatív, rendszeres adjuváns terápia ellenére is visszaesik. A szomorú prognózisban a korai stádiumban bekövetkező metasztatikus disszemináció, valamint a pancreas tumorok nagymértékű rezisztenciája is szerepet játszik, melyért részben a tumor körül fizikai gátat létesítő nagymértékű fibrotikus stróma okolható.

Többféle daganatban bizonyított a tumorsejtek és a nem-tumoros strómasejtek közötti interakció szerepe a tumor invázióban, növekedésben és metasztázis-képzésben. Ez a csökkent vaszkularizációval rendelkező komplex, különböző sejttípusból álló szövet megfelelő mikrokörnyezetet biztosít a daganat progressiójához. A stróma sejtes állományának 90%-át a tumor-asszociált fibroblasztok heterogén populációja alkotja. A főképp kollagént és extracelluláris mátrix proteinek termelő strómális fibroblasztok és a tumor sejtek interakciója gátolja a kemoterápiás hatóanyagok tumor sejtekhez való hatékony eljuttatását, emellett az általuk termelt citokinek és kemokinek elősegítik a tumor növekedését és a tumorelles immunválasz elkerülését. A pancreas daganatok nagy részénél még napjainkban sem áll rendelkezésre megfelelő hatékonyságú gyógymód, illetve megfelelő célzott daganatellenes kezelés, ezért a tumor-asszociált fibroblasztok ígéretes targetként szolgálhatnak az új célzott terápiák számára.

Ezt a koncepciót azonban nemrég két különböző kutató csoport is megkérdőjelezte. Transzgenikus egérmodelleken megfigyelték, hogy a stróma eltávolítása hátrányos, tumor agressziót növelő és a túlélést csökkentő hatást válthat ki. Mindazonáltal feltételezhető, hogy a tumor-asszociált fibroblasztok heterogén csoportján belül megkülönböztethetünk mind tumor növekedést segítő, protumorális, mind tumorelles funkciót ellátó, antitumorális szubpopulációt. Ezen ellentétes funkciók részletes tanulmányozásával betekintést nyerhetünk a tumor-asszociált fibroblasztok daganatképző mechanizmusába, ami olyan új terápiák alapjául szolgálhat, amelyek nem feltétlenül a sejtek fizikai eltávolítását, hanem szelektíven protumorális tulajdonságaik "újraprogramozását" célozzák.

A pancreas daganatok molekuláris szintű tanulmányozására Dr. Barbacid laboratóriumában transzgénikus egérmodelleket hoztak létre, melyeknél a *K-Ras* onkogén endogén expressziója a pancreas-specifikus – acinus sejtek által termelt – *elasztáz* promotor által kontrollált. Ezzel párhuzamosan történik az egyes tumorszupresszorok funkcióvesztésére tervezett génkiütés, mely ezáltal lehetőséget nyújt a tumorképződés genetikai modellezésére [*K-Ras*^{+/*LSLG12V*geo.}; *Trp53*^{lox/lox.}; *Elast*-tTA/TetO-Cre].

Munkám során hasnyálmirigy daganatos egérmodell segítségével vizsgáltam és karakterizáltam a tumor-asszociált fibroblasztok egy protumorális szubpopulációját, melyet a platelet derived growth factor alpha (*PDGFR* α) expressziója jellemez. Emellett azt is megfigyeltem, hogy *PDGFR* α ⁺ normál hasnyálmirigyből izolált fibroblasztok antitumorális hatást mutatnak. A normál és tumor-asszociált fibroblasztok összehasonlító transzkripciós analízise kimutatta, hogy a leginkább overexpresszált gén az *Saa3*, egy akut-fázis fehérje, ami a Serum Amyloid A apolipoprotein család egy tagja, melyek a nagy sűrűségű lipoproteinekhez (HDL) kapcsolódnak a vérplazmában. Az SAA proteinek expresszióját szöveti sérülés, illetve sejtkárosodás indukálhatja, beleértve az aterosclerotikus plakkokat, rheumatoid synovitist és bizonyos tumor sejteket is.

Eredményeink alapján az *Saa3* fehérje kulcsszerepet játszik a tumor-asszociált fibroblasztok protumorális tulajdonságainak kiváltásában hasnyálmirigy daganatos egerekben. Tanulmányunkban azt is meghatároztuk, hogy ezt a protumorális aktivitást a Membrane Palmitoylated Protein 6 (*Mpp6*), a peripheral membrane-associated guanylate kinases (*MAGUK*) család tagja szabályozza. Megfigyeléseink egy részét humán mintákban is validáltuk. Emellett a további tumor-asszociált fibroblasztokban túlműködő targetek pancreas tumorokban való szerepének tanulmányozására különböző génkiütött egérmodelleket hoztunk létre a gyors és hatékony CRISPR/Cas9 genomszerkesztési eljárással.

Anyagok és módszerek

PDAC transzgénikus egérmodell: A pancreas tumorok strómáját és a tumor-asszociált fibroblasztokat a $K-Ras^{+/LSLG12V_{geo}}$; $Trp53^{lox/lox}$; $Elas-tTA/tetO-Cre$ (KPeCY) PDAC modell segítségével tanulmányoztuk, melyet Dr. Mariano Barbacid laboratóriumában fejlesztettek ki korábban a $K-Ras^{+/LSLG12V_{geo}}$, a $Trp53^{lox/lox}$ és a bitranszgénikus $Elas-tTA/tetO-Cre$ egerek keresztezésével. A bakteriális Cre rekombinááz expressziója az acinus sejt specifikus *Elasztáz* promoter által kontrollált, melyet a doxiciklin által indukálható Tet operon negatív módon szabályoz (Tet-Off rendszer).

Sejt izolálás, sejt kultúrák

Primer tumor-asszociált és normál fibroblasztok, valamint tumor sejtek kitenyésztése (outgrowth) frissen eltávolított tumorminták felhasználásával KPeCY, illetve WT egerek egészséges pancreas szövetéből történt. Másik, fiziológiailag előnyösebb módszerként sejt szortolást alkalmaztunk, ahol mind a tumor minták, mind az egészséges pancreas minták ($Elas-tTA/tetO-Cre$; $Rosa26^{+/LSLEYFP}$) sejtuszupenzióvá alakítása után sejt felszíni jelöléssel választottunk szét $PDGFR\alpha^{+}/EYFP^{-}/CD45^{-}/CD31^{-}$ stróma sejteket és $EYFP^{+}$ tumor sejteket.

Gén expressziós mintázatok vizsgálata

A két különböző módszerrel izolált tumor-asszociált fibroblaszt populáció transzkriptom-analízisét RNS szekvenálással vizsgáltuk. A primer tumor-asszociált fibroblaszt kultúrák ($n = 3$) expressziós profilját összehasonlítottuk a normál fibroblasztokéval ($n = 3$). Az analízist megismételtük a sejt szortolással kinyert, frissen izolált fibroblasztokon (tumor-asszociált: $n = 5$, normál: $n = 3$) és az eredményeket összehasonlítottuk. Emellett funkcionális gén annotációs (gén ontológia) és jelpálya analízist (GSEA) is alkalmaztunk.

In vitro validálás

Az eredmények alapján kiválasztott targetek overexpresszióját *in vitro* qRT-PCR technikával validáltuk $PDGFR\alpha^{+}$ normál és tumor-asszociált fibroblasztokban. Tanulmányozásukra sejt vonalakat is létrehoztunk.

Subcutan és orthotopicus allograftok

Az immundeficiens nőstény nude egereket (NU- $Foxn1^{nu}$) a Harlan Laboratories biztosította. A különböző sejt kombinációkat: tumor sejtek (0.5×10^6), tumor sejt + tumor-asszociált vagy normál fibroblaszt ($0.5 \times 10^6 + 0.5 \times 10^6$) PBS – Matrigel 1:1

arányú keverékében subcutan oltottuk nude egerekbe. A tumor növekedést Caliper kézi tolómérővel 3 naponta mértük. Az ortopicus modellhez ugyanilyen arányban és kombinációban injektáltuk a sejteket. Az állatokat isofluoranos (4%) bódítással altattuk, fájdalomcsillapításra Buprenorfint használtunk, melyet a posztoperatív időszakban 3 napig adagoltunk. A tumor-növekedést mikroultrahanggal monitorizáltuk, az állatokat legkésőbb 3 héttel a műtét után termináltuk, a tumor mintákat caliperrel mértük és formalinban archiváltuk.

További génmódosított egérmodellek

Terápiás egértörzs: A $K-Ras^{+/FSFG12V}$; $Trp53^{fl/fl}$; $Elas-tTA/tetO-FLp(o)$; $Egfr^{lox/lox}$; $c-Raf^{lox/lox}$; $Ub-CreERT2$ PDAC egértörzs létrehozásához a módosított allélokat a megfelelő genotípus eléréséig kereszteztük laboratóriumunkban. Ebben a modellben a különböző rekombinázió technológiák adta lehetőségeket használtuk ki, amelyekkel a daganat fejlődése térben és időben is különválasztható.

Saa3 null mutáns egerek: az Saa3 knockout allélt homológ rekombinációval generáltuk BAC vector alkalmazásával, ahol a teljes fehérje kódoló szekvencia a LacZ gén és egy neomicin rezisztencia kódoló szekvenciájára cserélődik és a transzláció nem megy végbe. Az *Saa3 null* mutáns egerek rederiválása és bevitele KPeCY egerek in vitro fertilizációjával történt.

CRISPR knockout egérmodellek: a CRISPR/Cas9 hatékony génmódosító rendszer, ami lehetőséget nyújt többszörös mutáns knockout egyedek létrehozására egy guide RNS és a Cas9 fehérje mRNS-ének mikro-injektálásával. A guide RNS-ek hatékonyságát in vitro vizsgáltuk és validáltuk. A guide RNS és a Cas9 fehérje mRNS szekvenciájának mikro injektálása a terápiás modell donor nőtényeiből leszármazott zigóta citoplazmájába együttesen történt. Ezután az embriókat álvemhes nőtényekbe transzferáltuk. A genotipizálásra PCR stratégiát terveztünk, a knockout mutációt validáltuk.

Humán minták

A primer tumor minták a 'Virgen de la Arrixaca' Kórház tumor bankjából érkeztek (Murcia, Spanyolország). Kísérleti felhasználásukat a páciensek hozzájárulásával és a Spanyol Nemzeti Rákkutató Intézet (CNIO) Etikai Bizottságának engedélyével végeztük. Emellett a heidelbergi Német Rákkutató Intézet (DKFZ) kutató csoportjával kollaborációban vizsgáltunk humán tumor mintákat, melyekből sejtszortolással izoláltak különböző tumor és stróma sejtpopulációkat, az egereknél látott módszerhez hasonlóan.

Célkitűzések

Munkám során a pancreas tumorok mikrokörnyezetének célzott terápiás lehetőségeit vizsgáltam a tumor-stróma interakció mechanizmusian keresztül. Tanulmányunkban az alábbi célokat tűztük ki:

1. A tumor-asszociált és a normál fibroblasztok génexpressziós profiljának összehasonlító analízise alapján megfelelő targetek kiválasztása, melyek segíthetnek újraprogramozni a tumor-asszociált fibroblasztok protumorális tulajdonságait pancreas tumorokban.
2. A kiválasztott targetek funkcionális *in vitro* és *in vivo* validálása.
3. A targetek szerepének tanulmányozása a pancreas ductalis adenocarcinomájának progressziójában knockout allélok genetikailag módosított PDAC egérmodellben való létrehozásával.

Hipotézis

Feltételeztük, hogy a tumor-asszociált fibroblasztok újraprogramozása - mellyel tulajdonságaik ismét a normál fibroblasztokhoz hasonlónak válnak - egyrészt megakadályozná a tumoros progressziót, másrészt - ahogy azt más kutatócsoportok korábban kimutatták - elkerülhető lenne a stróma eltávolítása és az azzal járó negatív következmény, vagyis a tumor aggresszivitásának provokálása a strómában egyidejűleg jelen lévő gátló fibroblasztok eltávolítása miatt.

Eredmények

Fibroblasztok gén expressziós analízise

Hipotézisünk bizonyításához először tumor asszociált és normál fibroblasztokat izoláltunk KPeCY és WT egerekből két különböző módszerrel: kitenyésztéssel (outgrowth) és sejtszortolással. Ezt követően, a különböző fibroblaszt populációk gén expressziós profiljának tanulmányozásával vizsgáltuk szerepüket a tumoros progresszióban. Az összehasonlító analízis kimutatta, hogy 117 gén overexpresszált mindkét TAF populációban. A legjelentősebb aktivitást mutató gének az akut fázis fehérjék csoportjába tartoztak, melyek közül a legmagasabb expressziót a Serum Amyloid A3 fehérje mutatta. Ezen kívül a GSEA jelpálya-analízis számos, mindkét TAF populációnál szereplő, nagymértékben túlműködő jelpályát írt le, köztük a complement rendszert, a citokin-receptor kapcsolatot, valamint a természetes immunválaszhoz kapcsolódó jelpályákat, mint például az NF- κ B. Figyelembe kell azonban venni, hogy a kitenyésztéssel izolált TAF populáció szennyezett lehet más sejtekkel és a sejttenyésztési körülmények is befolyásolhatják a gén expressziót. Ez megmagyarázhatja a TAF-ok differenciál expressziójának elemzése közötti különbségeket. Ezért úgy döntöttünk, hogy a továbbiakban PDGFR α + TAF-ok szubpopulációját jellemezzük, azért, hogy elkerüljük a többi sejttípus által okozott eltéréseket, és a frissen izolált, fiziológiai szempontból relevánsabb TAF-ok csoportját tanulmányozzuk.

Protumorális TAF-ok és antitumorális NPF-ek

A PDGFR α + TAF-ok tumornövekedést serkentő képességét in vivo vizsgálatokkal határoztuk meg NPF-ekkel összehasonlítva. KPeCY egerek tumormintáiból izolált EYFP+ tumorsejteket (0.5×10^6) és ezek TAF-okkal (0.5×10^6), illetve NPF-ekkel (0.5×10^6) való kombinációját injektáltuk szubkutan nude egerekbe. Míg a TAF-ok 75%-kal stimulálták a tumor sejtek növekedését, az NPF-ek gátolták a sejtproliferációt. Ezek az eredmények szemléltetik a TAF-ok PDGFR α + szubpopulációjának protumoralis aktivitását.

Target választás és *in vitro* validálás

PDGFR α + TAF-ok és a NPF-k génexpressziós profiljai alapján potenciális célpontként választottunk, majd *in vitro* validáltunk olyan géneket, amelyek teljesítették főbb kritériumainkat. Ezek közé tartozik a gyógyszerrehozhatóság, a target szignifikáns túltermelése TAF-okban, de alacsony expresszió NPF-ekben; valamint relevancia a tumorprogresszióban és a human tumorok patológiájában. A jelölt gének listáját a TAF-okban való overexpresszió és qPCR-es validálás csökkentette le, amely végül több gén kiválasztását eredményezte: Serum Amyloid A 3 (Saa3), Hialuronsav szintáz 1 (Has1), Lumican (Lum), Haptoglobin (Hp) és Mesothelin (Msln). Az Saa3 és a Hp a krónikus gyulladásban is szerepet játszó akut fázis fehérjék közé tartozik, míg a Lum és Has1 fehérjék fontos szerepet töltenek be a fibrosisban és az ECM termelésében. Az utóbbi a hialuronsav előállításáért felelős, ami a stróma szerkezeti és fizikai tulajdonságait jelentősen meghatározó mátrixkomponens. Végül a Mesothelin fehérje egy daganat antigén, amely a hasnyálmirigy rák megbízható markerjeként javasolt, azonban feladata nem ismert. Ez alapján feltételeztük, hogy a kiválasztott gének funkcionális vizsgálata segíthetne a TAF-ok PDAC-ban való szerepének részletes megértésében, akár immunszupresszióban, akár fizikailag indukált terápiás rezisztenciában.

***In vivo* target validálás és egérmodellek előállítása**

A célpontok shRNS által közvetített lecsendesítése kimutatta a kiválasztott gének funkcionális szerepét a tumor-stróma kommunikációjában. A tumorsejteket immunodeficiens egerekbe kontroll shRNS-sel fertőzött TAF-okkal ko-injektáltuk, illetve olyan TAF-okkal, amelyekben az Saa3, Has1 vagy Lum sejtek expresszióját gátolt. A tumor növekedésének monitorozása kimutatta, hogy a géncsendesített TAF-okban mindhárom gén esetében csökkent a tumor mérete a kontroll shRNS-sel kezelt TAF-okhoz képest. A legjelentősebb különbség az Saa3 fehérje expressziójának gátlásával volt elérhető. Ezért a legfontosabb jelöltünk, az Saa3 szerepének tanulmányozására a pancreas tumorok progressziójában, hagyományos gén célzással hoztunk létre knockout egereket. A többi célgén szerepének vizsgálatához az új és gyors génszerkesztő technológiát, a CRISPR / Cas9-t használtuk és állítottunk elő knockout PDAC egérmodelleket. Ezzel a módszerrel ugyanakkor lehetőség nyílik a gének hatékony gátlására, valamint arra, hogy egyidejűleg több különböző génmutációt generáljunk.

A Has1 guide RNS-ét és a Cas9 mRNS-t a "terápiás PDAC egérmodell" -ből származó zigotákba juttattuk mikroinjekcióval, amely 4, transzmisszióra képes knockout kimérát eredményezett. Azonban az egértörzs véglegesítéséhez és jellemzéséhez több generációs keresztezés vált szükségessé. Ezenkívül a CRISPR / Cas9 rendszer használata során figyelembe kell venni a többszörös mutáció keletkezésének esélyét és azok azonosítását. Így a Has1 knockout egér modell kifejlesztése 44%-os hatékonyságot eredményezett. Ez után, annak érdekében, hogy kihasználjuk a rendszer kapacitását, tripla mutáns egereket hoztunk létre a Lum, a Hp és a Msln egyidejű kiütésére. Három mikroinjektálás alkalmával a folyamat eredményeképpen 25 kiméra született, amelyekből 3 egyedülálló, 5 kettős és 2 tripla mutáns egér volt képes továbbítani a módosítást az következő generációba. Ezen modellek segítségével lehetőség nyílik a Lum, a Hp és az Msln fehérjék pancreas tumorokban való szerepének jövőbeli tanulmányozására.

Hasnyálmirigy daganat képződése

Az Saa3 csírvonal eltávolítása általánosságban nem gyakorolt szignifikáns hatást a PDAC fejlődésre, amint azt a túlélési előny hiánya tükrözi. Azonban az Saa3 null tumorokban a stróma átalakult, beleértve a csökkent fibrózist és extracelluláris matrixot, a beszivárgó makrofágokat és a megnövelt vaszkularizációt. A tumorok fizikai gátjának kollektív csökkenése és a vaszkularizáció emelkedése azt sugallja, hogy a gyógyszerek könnyebben jutnak el a tumorsejtekhez és hatékonyabban tudnak fellépni velük szemben. Annak ellenére, hogy a standard kemoterápia során gemcitabin és strómacélzó készítmények kombinációjának adásakor az egérmodellekben a terápiák hatékonyságának marginális javulását figyeltük meg, a daganatok továbbra is kevésbé érzékenyek maradtak, mely bizonyítékot szolgáltat arra vonatkozóan, hogy a jellemző csökkent vaszkularizáció és a tumorszövet merevsége nem a PDAC terápiás rezisztenciájának egyetlen felelősei.

Az Saa3 fehérje teljes eltávolítása csökkenti a máj metasztázis előfordulását

Másrésről, ezek a szerkezeti változások a daganatkompozícióban valószínűleg megfelelő környezetet biztosítanak a tumorsejtek primer tumorból való elvándorlására. Ezen felül, az Saa3 null tumorok szövetmintái kevésbé differenciálódott és invazívabb képet mutattak, amint azt a magasabb proliferációs index és a tumoros őssejtek számának növekedése sugallja. Továbbá, az Saa3 null tumorsejteknek fokozódott a migrációs képessége is. A májba migráló Saa3 null tumorsejtek jelentős mennyiségét figyeltük meg már a hasnyálmirigy daganatképződés korai stádiumaiban, ami az összes

májsejt 15% -át képezte. Azonban ezek a sejtek nem tudtak metasztatikusokat kialakítani, ami az Saa fehérje-család fontos szerepére utal a metasztatikus terjedés folyamatában.

Legfontosabb változások az *Saa3* kompetens és az *Saa3 null* KPeCY egérmodellben.

<i>KPeCY</i> egérmodell jellemzők	<i>Saa3 WT</i>	<i>Saa3 KO</i>
Stróma átalakulása		
• ECM	+++	+
• Vaszkularizáció	+	++++
• Infiltráló makrofágok	+	++++
• Egyéb immunsejtek	+	+
TAF-ok		
• Tumor növekedést serkentő hatás	+++	-
• Sebgyógyulás hatékonysága (<i>in vitro</i>)	++	+++
Tumor sejtek		
• Differenciáció	++	+
• Daganat őssejtek (CSC)	+	+++
• Migrációs jellemzők (<i>in vitro</i>)	+	++++
Máj metasztázis		
• Makro-metasztázis	++	-
• Mikro-metasztázis	++	+
• Vándorló tumorsejtek	+	++++

A TAF-ok az *Saa3/Mpp6* tengelyen keresztül fejtik ki tumor-serkentő hatásukat PDAC egér modellben

Az *Saa3*-null TAF-ok és az *Saa3* kompetens tumorsejtek injekciója nude egerek hasnyálmirigyébe jelentősen lecsökkentette a tumor méretét a kontrollhoz hasonlítva. Az *Saa3* null TAF-ok gátló hatása még erőteljesebb volt, mint amit korábban az NPF-eknél találtunk. A fenti eredményeket *in vitro* tumor organoidok alkalmazásával is megfigyeltük, mely kizárja egy harmadik sejtípus feltételezett szerepét ebben a tumor-stróma interakcióban. Ezek a tumor rekonstrukciós kísérletek összhangban vannak a transzgénikus *Saa3* null PDAC egérmodellel kapott eredményekkel, ahol mind a TAF-okból, mind a tumorsejtekből hiányzik az *Saa3* aktivitás. Ez magyarázatot ad arra, hogy pancreas daganatképződés miatt nem befolyásolt az *Saa3* null egerekben.

Az *Saa3* kompetens és *Saa3* null TAF-ok transzkripciós összehasonlító elemzése csak kisebb változásokat mutatott, mégis három fokozott aktivitású gént azonosítottunk az

Saa3 deficiens TAF-okban. Ezek közül az Mpp6 expressziója emelkedett a legjelentősebben. Ez a perifériás MAGUK fehérje család tagja, amely elsősorban a hámsejtek polaritásának szabályozásában játszik szerepet. Emellett az Mpp-k tumorszuppresszorként és receptor-klaszterben is funkcionálnak, különféle transzmembrán, citoskeletális és citoplazmatikus jelátviteli fehérjéket tartalmazó protein komplexek kialakításával. Érdekes módon az Mpp6 túltermelés mutatkozott felelősnek az Saa3 null TAF-ok csökkent protumorális hatásáért. Ezt illusztrálta az Mpp6-expresszió lecsendesítése a mutáns TAF-okban, mely visszaállította azok protumorális tulajdonságait tumorsejtekkel való ko-injekciós vizsgálatokban. Ezen felül az Mpp6 expressziós szintjét nem befolyásolta az Saa3 jelenléte vagy hiánya a tumorsejtekben, ami azt sugallja, hogy az Saa3 és Mpp6 közötti funkcionális kapcsolat specifikusan TAF-okra korlátozódik. A TAF-ok protumorális tulajdonságait gátló Mpp6 hatásmechanizmusának részletesebb tanulmányozása módot adhat új terápiás lehetőségek megismerésére.

SAA1 humán PDAC-ban

Végül megfigyeléseink felhasználhatóságát humán pancreas daganatokban is vizsgáltuk, melynek során humán TAF-okat és NPF-eket izoláltunk szövettényézzel PDAC betegmintákból és a szomszédos normál szövetekből. Az expressziós profiljukat RNS szekvenálással hasonlítottuk össze. A humán és az egér TAF expressziós profilok közötti hasonlóságot GSEA jelpálya-analízissel igazoltuk. Humán TAF-okban a legjelentősebb upregulációt a citokin-receptor kölcsönhatás és komplement kaskád mutatta, hasonlóan az egér TAF-oknál történt megfigyelésekhez.

Ezt követően megvizsgáltuk a SAA fehérjék szerepét is human pancreas daganatokban, ahol az hSAA3P egy átíródó pszeudogén. Azonban az SAA1 fehérje szerkezeti és funkcionális jellemzői nagyon hasonlítanak az egér Saa3 fehérjére, ami arra utal, hogy az egér Saa3 humán ortológja az SAA1.

Az SAA1 fokozott túlműködését detektáltuk humán TAF-okban NPF-ekhez képest. Ezenkívül a humán PDAC tumorok strómális komponensében az SAA1 expresszió magas szintje szignifikánsan rosszabb túléléssel korrelál, függetlenül attól, hogy a tumorminták "normál" vagy "aktivált" stróma típust tartalmaznak. Az alacsony strómatartalmú daganatmintákban a magas SAA1 expresszió viszont kissé megnövekedett túlélést eredményez. Ezek az eredmények az sugallják, hogy az SAA1-nek protumorális hatása lehet, ha erősen expresszálódik a strómában, viszont lehetséges daganatellenes hatást fejt ki tumorsejtekben való túlműködése esetén. Az SAA

fehérjéknél hasonló, a sejtípustól és kontextustól függő kettős szerepét korábban már más kutató csoportok is kimutatták. Ezen felül az MPP6 expressziója fordítottan korrelált az SAA1 szintjével humán PDAC mintákban. Ezért eredményeink alátámasztják azt a koncepciót, hogy az egér Saa3 modellként szolgálhat a humán akut fázisú SAA1 fehérje szerepének tanulmányozására hasnyálmirigyekben, valamint alkalmas lehet új terápiás stratégiák kifejlesztésére az SAA1, mint potenciális célpont ellen.

Következtetések

1. A tumor-asszociált fibroblasztok (TAF-ok) a pancreas ductalis adenocarcinomájának (PDAC) heterogén populációját alkotják. A TAF-ok PDGFR α + szubpopulációja erős gyulladáshoz asszociált gén expressziós profilt mutat összehasonlítva a PDGFR α + normál pancreas fibroblasztokéval (NPF-k), különös tekintettel a veleszületett immunválaszra, a citokin-receptor interakcióra és a komplementrendszer aktivitásának emelkedésére.
2. A PDGFR α + TAF-ok protumorális, míg a PDGFR α + NPF-ek antitumorális hatásúak *in vitro* hasnyálmirigy tumor-organoid ko-kultúrában, illetve *in vivo* tumorsejtekkel együtt subcutan injekciózva nude egerekbe.
3. A PDGFR α + TAF-ok összehasonlító transzkripciós analízise az Saa3-at mutatta a legmagasabban overexpresszált génnek, melyet az shRNS-sel által történő funkcionális validálás potenciális TAF célponttá minősített.
4. Az *in vivo* vizsgálatokhoz további targeteket is jelöltként választottunk, például a Haptoglobin, Lumican, Has1 és Mesothelin géneket, mivel teljesítették az alábbi szelekciós kritériumainkat: overexpresszió TAF-okban, alacsony expresszió NPF-ekben, funkcionális és humán relevancia pancreas daganatokban. Ezen gének knock-out alléljait a CRISPR / Cas9 genomszerkesztő módszerrel beépítettük terápiás PDAC egérmodellünkbe. Egyszeresen mutálódott knockout egereket a Has1 fehérje tanulmányozására, többszörösen mutálódott knockout egereket a Haptoglobin, Lumican és Mesothelin hármas kombinációjára hoztunk létre.
5. A Saa3 csírvonal génkiütése PDAC egérmodellben nem befolyásolja a daganatképződést, amint azt a K-Ras onkogén által indukált, p53 aktivitás jelenlétében kialakuló PanIN-léziók közti hasonlóság tükrözi. Ez összhangban van a p53-hiányában keletkező tumorok miatti szignifikáns halálozási különbség hiányával. Azonban az Saa3 inaktiválásával a tumorok kevésbé differenciált fenotípust mutatnak.
6. Az Saa3 eltávolítása a tumoros stróma átalakulását is eredményezte, nevezetesen: az extracelluláris mátrix csökkenését és reorganizációját, valamint a vaszkularizáció és a makrofág-infiltráció növekedését. Azonban, ezek a

strómális változások nem eredményeztek jelentős terápiás előnyt hasnyálmirigy daganatos egerek Gemcitabin, illetve annak makrofág-lebontó ágens (Clodronate) vagy VEGF-blokkoló antitest kombinációjával való kezelésekor.

7. Az Saa3 a PDGFR α + TAF-k protumorális tulajdonságainak közvetítője, amint azt a tumor méretének jelentős csökkenése mutatja, Saa3 null TAF-ok és Saa3-t expresszáló tumorsejtek nude egerek hasnyálmirigyébe injektálásakor. Ugyanazokat az eredményeket figyeltük meg *in vitro* tumor organoid – fibroblaszt ko-kultúrában. Azonban a Saa3 null TAF-ok tumorelles hatása elvész, amikor a tumorsejtekben is inaktivált az Saa3 expressziója.
8. Az Saa3 null TAF-ok antitumorális tulajdonságait a membránhoz kapcsolódó guanil-kináz-családtag (MAGUK) Mpp6 tight junction fehérje közvetíti, amint az az Saa3 null és Saa3 kompetens TAF-ok transzkripció profil elemzéséből és ortotópikus tumor-rekonstrukciós kísérletekből kiderült. Az Mpp6 csendesítése Saa3 null TAF-okban visszaállította a tumor növekedését elősegítő tulajdonságaikat.
9. A Saa3 null tumorsejtek *in vitro* fokozott migrációt mutattak, melyet *in vivo* a pancreas tumoros egerek májában jelentősen szétszóródott tumorsejtek bizonyították. Mindazonáltal ezek a tumorsejtek nem voltak képesek proliferációra és nem eredményeztek metasztatikus kinövést.
10. Az SAA1, az egér Saa3 humán ortológja túlműködik humán PDAC mintákban és TAF-okban. Ezenkívül ez a túlzott expresszió szignifikánsan rosszabb túléléssel korrelál a hasnyálmirigy stróma-típusainak transzkripcionális elválasztásakor. A SAA1-MPP6 expresszió negatívan korrelál a humán TAF-okban. Ezért az általunk generált PDAC egérmodell segíthet olyan terápiás lehetőségeket tanulmányozni, amelyek klinikai relevanciával is rendelkezhetnek.

A hatékony kezelés megtalálása érdekeben a preklinikai és klinikai vizsgálatokba fektetett erőfeszítés ellenére a pancreas ductalis adenocarcinómája továbbra is gyógyíthatatlan betegség, amely csak lassú terápiás előrehaladást mutat. Ezért fontos, hogy olyan új stratégiákat keressünk, amelyek a pancreas tumorok komplex pathobiológiájának megismerésére összpontosító tanulmányokon alapulnak, és segíthetnek a jövőbeli terápiák tervezésében. Összességében ez a tanulmány mélyebb betekintést nyújt a tumor-asszociált fibroblasztok molekuláris és funkcionális biológiájába, valamint fontos terápiás lehetőségeket vázol fel, melyek hatással lehetnek a hasnyálmirigyek kezelésére.

Publikációk

Témához kapcsolódó publikációk:

Djurec M, Graña O, Lee A, Troulé K, Espinet E, Cabras L, Navas C, Blasco MT, Martín-Díaz L, Burdiel M, Li J, Liu Z, Vallespinós M, Sanchez-Bueno F, Sprick MR, Trumpp A, Sainz Jr B, Al-Shahrour F, Rabadan R, Guerra C, Barbacid M. (2018) Saa3 is a key mediator of the protumorigenic properties of cancer-associated fibroblasts in pancreatic tumors. *Proc Natl Acad Sci* 115(6):E1147–E1156.

Nem témához kapcsolódó publikációk:

Sanclemente M, Francoz S, Esteban-Burgos L, Bousquet-Mur E, **Djurec M**, Lopez-Casa P, Hidalgo M, Guerra C, Drosten M, Musteanu M, Barbacid M. (2018) c-RAF Ablation Induces Regression of Advanced Kras/Trp53 Mutant Lung Adenocarcinomas by a Mechanism Independent of MAPK Signaling. *Cancer Cell* 33(2):217–228.e4.