

Na Kang

Dr. sc. hum.

Characterization of G Protein Beta Subunit 1 as Regulator of Tumour Initiating Cell Activity in Human Pancreatic Cancer

Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Hanno Glimm

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist die dritthäufigste Ursache krebserregender Todesfälle in den Vereinigten Staaten von Amerika. In vorausgegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass transient aktive tumor-initiiierende Zellen das Fortschreiten und die Erhaltung von Pankreastumoren vorantreiben. Aufgrund dieser Plastizität mag es förderlich sein, den Zustand der funktionellen Aktivität tumor-initiiierender Zellen therapeutisch anzugreifen und nicht die Zellpopulation tumor-initiiierender Zellen selbst. In vorausgegangenen Arbeiten dieser Gruppe wurden der Mechanismus sowie potentielle Regulatoren der tumor-initiiierenden Aktivität im Pankreaskarzinom untersucht. Hierbei wurden drei Kandidatengene als mögliche Regulatoren tumor-initiiierender Zellaktivität identifiziert: *guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1*, *solute carrier family 35 member F5* und *son of sevenless homolog 2*. Diese Ergebnisse wurden in immundefizienten Mäusen validiert, wobei der Beitrag von *guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1* als potentieller Regulator tumor-initiiierender Zellaktivität bestätigt werden konnte. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass Zellklone, welche *guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1* überexprimierten, kontinuierlich zur Tumorbildung in Xenotransplantaten beitrugen, während Zellen, in denen dieses Gen herunterreguliert wurde, in den Xenotransplantaten verschwanden. Diese Ergebnisse zeigten außerdem, dass die Überexpression von *guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1* die Proliferation der Zellen förderte.

In dieser Arbeit werden 1) identifizierte potenzielle Regulatoren tumor-initiiierender Zellen validiert und 2) der Mechanismus der tumor-initiiierenden Zellaktivierung genauer charakterisiert. Des Weiteren werden 3) patienten-spezifische alpha- und gamma-Untereinheiten Guanosintriphosphat-bindender Proteine sowie weitere Regulatoren identifiziert, welche an *guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1* in etablierten patientenabgeleiteten Pankreaskarzinomkulturen binden.

Um den Beitrag von *guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1* zur tumor-initiiierenden Zellaktivität zu adressieren, wurde eine primäre patientenabgeleitete Pankreaskarzinomkultur mittels Einzelzell-Ribonukleinsäuresequenzierung untersucht. Diese Analyse zeigte eine heterogene Expression des Gens, was dessen Beitrag zur tumor-initiiierenden Zellaktivität unterstreicht. Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass die Expression des β -Arrestin Signalwegs mit hoher *guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1* Expression korreliert.

Der zu Grunde liegende Mechanismus wurde durch *guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1* ausgelöste Signalwegsänderungen in der epithelialen Pankreas-Zelllinie H6C7 mit und ohne Mutation im *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* Gen genauer untersucht. Hierbei wurde der phosphatidylinositol 3-kinase Signalweg als wichtiger Signalweg identifiziert. 3-Phosphoinositide dependent protein kinase 1, ein zentrales Molekül im phosphatidylinositol 3-kinase Signalweg zeigte eine 6-fach höhere Proteinexpression in H6C7 *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* Wildtyp Zellen mit *guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1*

Überexpression im Vergleich zu Kontrollzellen. In Zellen mit mutiertem *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* Gen lag sogar eine 56-fach höhere Expression vor. Diese Beobachtung legte nahe, dass die Überexpression von guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1 die tumor-initiiierende Zellaktivität im duktalem Adenokarzinom des Pankreas durch Aktivierung des phosphatidylinositol 3-kinase Signalwegs reguliert und dass 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1 ein wichtiger Effektor von guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1 ist.

Um Interaktionspartner von guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1 zu identifizieren, wurde ein Pulldown Experiment durchgeführt. Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma 12, guanine nucleotide-binding protein subunit alpha 11 und potassium channel tetramerization domain containing 5 wurden mittels Massenspektrometrie als Interaktionspartner in primären duktalem Pankreaskarzinomen identifiziert und durch Ko-Immunopräzipitation validiert. Diese Interaktion mit den genannten Untereinheiten der Guanosintriphosphat-bindenden Proteine konnte hier im duktalem Adenokarzinom des Pankreas gezeigt werden.

Weiterführende Experimente werden darauf abzielen, den Zusammenhang zwischen guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1 und 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1 zu untersuchen und den Mechanismus der Aktivierung des phosphatidylinositol 3-kinase Signalwegs durch guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1 zu verstehen. Zusätzlich sollten weitere Effektoren Guanosintriphosphat-gekoppelter Rezeptoren untersucht werden. Außerdem gilt es zu klären, welche Rolle guanine nucleotide-binding protein subunit alpha 11 in guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1 vermittelter tumor-initiiierender Zellaktivität spielt. Hierfür sollten weitere Pankreaskarzinome charakterisiert werden, um gemeinsame universelle Eigenschaften duktalem Adenokarzinomen des Pankreas zu definieren.

Diese Studie konnte den Beitrag von guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1 als Regulator tumor-initiiierender Zellaktivität im Pankreaskarzinom validieren und zeigen, dass dessen Überexpression die Aktivierung des phosphatidylinositol 3-kinase Signalwegs bewirkt, in welchem 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1 dann als Effektor fungiert. Dieser Zusammenhang könnte den Mechanismus der tumor-initiiierenden Zellaktivierung durch guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1 erklären. Die hier gezeigte heterogene Expression von guanine nucleotide-binding protein subunit beta 1 in einer primären Pankreaskarzinomkultur liefert weitere starke Hinweise auf die Funktion als Regulator tumor-initiiierender Zellen und macht es somit zu einem interessanten Kandidaten für weitere Studien. Zusätzlich wurde außerdem die Kombination verschiedener Untereinheiten Guanosintriphosphat-bindender Proteine in einer Pankreaskarzinomkultur charakterisiert. Diese Erkenntnisse könnten das Angreifen tumor-initiiierender Zellaktivität im duktalem Adenokarzinom des Pankreas als neue therapeutische Strategie ermöglichen.