

Hanxue Sun
Dr. med.

The pancreatic cancer-initiating cell markers CD44v6 and Tspan8 in tumor exosomes affect multiple activities of non-metastasizing tumor cells: Confirming and expanding insight by coimmunoprecipitation and deep sequencing

Fach/Einrichtung: Chirurgie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Thilo Hackert

Patienten mit Pankreaskarzinom (PaKa) haben eine extrem schlechte Prognose. Dies liegt an der frühzeitigen Metastasierung, die einer chirurgischen Intervention als einziger kurativer Behandlung entgegensteht, und an der Resistenz gegen Chemotherapeutika. Es gibt Hinweise, dass diese tödlichen Eigenschaften des PaKa auf wenige tumorinduzierende Zellen (TIZ) unter aktiver Beteiligung sogenannter TIZ-Biomarker zurückzuführen sind. Zwei prominente PaKa TIZ-Biomarker sind CD44v6 und Tspan8. TIZ agieren über von Tumorzellen freigesetzte Exosomen (TEX). Daher könnten Untersuchungen zur Beteiligung von CD44v6 und Tspan8 an der TEX Biogenese und deren Wirkung auf nicht-metastasierende PaKa Hinweise auf neue therapeutische Ansätze liefern.

Die Thematik wurde mittels parentaler, CD44v6- und Tspan8-knockdown (kd) sowie TIZ angereicherter PaKa Zelllinien und TEX bearbeitet. Die Populationen wurden mittels Proteomanalyse nach Ko-Immunpräzipitation und Genom-Sequenzierung charakterisiert und schloss Ko-Kulturen der kd-Linien mit TIZ-TEX ein. Datenbanken umfassten PANTHER, KEGG, Reactome, und STRING und IPA für die Korrelation zwischen mikroRNS und voraussichtlicher Ziel-mRNS. Ausgewählte Befunde wurden mittels Durchflusszytometrie, Immunhistochemie, Western Blot, und qRT-PCR, und Funktionsstudien überprüft. *In vivo* Untersuchungen erfassten Tumorstadium, Überlebenszeit und Metastasierung.

Ko-Immunpräzipitation deckte die Assoziation von CD44v6 und Tspan8 sowie einen Einfluss von CD44v6 auf die Transkription von Tspan8 auf. Tspan8 ist für Bildung früher Endosomen essentiell, wobei die Tetraspanin-angereicherten Mikrodomänen (TEM) komplett internalisiert werden, und leitet die separate Wanderung früher Endosomen zu multivesikulären Körperchen. CD44v6 ist an der selektiven Beladung der Endosomen während der Invagination intraluminaler Vesikel in multivesikuläre Körperchen beteiligt. CD44v6- und Tspan8-assoziierte Moleküle finden sich bei Aufrechterhaltung der Abundanz in TEX.

Der Einfluss von TEX auf den Wirt hängt essentiell von Bindung/Aufnahme durch Komponenten des Wirts ab. *In vitro* Ko-Kulturen von kd Zellen mit TIZ-TEX und *in vivo* Evaluierung TIZ-TEX-behandelter kd tumortragender Nacktmäuse belegten die essentielle CD44v6 und/oder Tspan8 Expression auf TIZ-TEX, nicht aber auf der Zielzelle. Dem exosomalen TEM-Komplex kommt daher eine prominente Rolle bei der Wechselwirkung mit dem Wirt zu.

Eine Übersichtsanalyse der Genomsequenzierung erfasste den Einfluss von TIZ-TEX auf Transkription/Translation, Transport, Onkogene, Angiogenese, Apoptose, extrazelluläre Matrix und Signaltransduktion. Die führende Rolle nahmen Veränderungen in der Signaltransduktion ein. Die Veränderungen in dieser und allen folgenden Analysen waren in CD44v6kd-Zellen erheblich stärker als in Tspan8kd-Zellen. Die Analyse lieferte auch Hinweise auf eine fehlende Korrelation zwischen der Präsenz in TIZ-TEX und der Modulation der Zielzelle. Aber, in der Zielzelle wurde häufig eine inverse Korrelation zwischen Veränderung der MikroRNS und wahrscheinlicher Ziel-RNS beobachtet.

Veränderungen in der Signaltransduktion auf Proteinebene und *in vivo* bestätigten die Dominanz von Zellmembranrezeptoren im Vergleich zu zytosolischen Molekülen. Auch TIZ-TEX-initiierte Veränderungen potenzieller Zielzell-RNS betraf vornehmlich G-Protein-gekoppelte und Wnt Rezeptoren.

TIZ-TEX übten kaum einen Einfluss auf Apoptoseresistenz aus. Eine prominente Ausnahme stellte TIZ-TEX-geförderte Apoptoseresistenz über die Promotion von Arzneimitteltransportern ausschließlich in CD44v6kd Zellen dar.

Die letzte Zielgruppe der Sequenzierungsanalysen befasste sich mit dem Einfluss von TIZ-TEX auf EMT. Von den klassischen EMT-Markern war nur N-Cadherin in CD44v6kd und Tspan8kd Zellen und Fibronectin in Tspan8kd Zellen leicht reduziert. Hingegen wurde die Expression einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und Transkription-regulierender Gene durch TIZ-TEX beeinflusst. Dies galt auch für Ziel-mRNS von MikroRNS. Gene der Wnt Signaltransduktion waren am häufigsten betroffen. Eine Kontrolle auf Proteinebene ergab, dass die Reduktion von NOTCH und Nanog in beiden kd Linien und von Snail, Twist und Wnt5a/b in CD44v6kd Zellen durch TIZ-TEX Behandlung korrigiert wurde. Die Behandlung der kd Zellen mit TIZ-TEX beeinflusste auch die Expression von Adhäsionsmolekülen. Neben der gesteigerten Expression von Integrinen und Matrixproteinen, sei die erhöhte Expression von CEACAM5 erwähnt, das durch Kompetition E-Cadherin-vermittelte Adhäsion verhindern könnte.

Zusammenfassend ergaben Datenbank Analysen und IPA keinen Hinweis auf einen Transfer von TIZ-TEX in die Zielzellen. Hingegen stehen alle Befunde in Einklang mit der Annahme, dass TIZ-TEX einen Anstoß zur Aktivierung inhärenter Programme der kd Zellen liefern.

Abschließende *in vivo* Experimenten überprüften die Effizienz der TIZ Marker bei der Modulation der kd Tumorzellen. Zur Blockade wurde ein anti-Tspan8 Antikörper eingesetzt. Zum Vergleich wurde das Zytostatikum Gemcitabin appliziert. Anti-Tspan8 und Gemcitabin bewirkten eine leichte Verzögerung des lokalen Tumorwachstums, allerdings mit signifikant differierender Kinetik. Beide „Therapeutika“ inhibierten Angiogenese, nur anti-Tspan8 Lymphangiogenese. Anti-Tspan8 und Gemcitabin führten zu einer hochsignifikanten Reduktion der Metastasierung. Gemcitabin unterstützte die Reifung myeloider Progenitorzellen zu myeloiden Suppressorzellen. Die Blockade eines TIZ Markers und ein Chemotherapeutikum interferierten bei gleicher Effizienz aber unabhängiger Mechanismen mit der Tumorprogression.

In Kürze,

1. TEM-lokalisiertes Tspan8 übernimmt eine führende Rolle in der TEX Biogenese und die Zahl TEM-abgeleiteter TEX übersteigt eklatant die Zahl an TEX unterschiedlicher Biogenese.
2. CD44v6, nicht aber Tspan8, trägt zur Beladung des Zytosols der TEX bei.
3. TEX agieren als Dreh- und Angelpunkt zielzell-inhärenter Aktivierung.
4. Aufgrund der Vielzahl der CD44v6 Liganden dominiert TEX-CD44v6 bei der Zielzell-Modulation.
5. TIZ-TEX Bindung/Aufnahme als Angelpunkt zielzell-inhärenter Modulation hat weitreichende Konsequenzen für das biologische Verständnis der Aktivität von Exosomen.

Ich bin mir der Beschränkungen dieser Dissertation bewusst, die ich umfassend diskutiere. Desungeachtet wurde die umfassende Sequenzanalyse der durch TIZ-TEX initiierten Veränderungen in nicht-metastasierenden Tumorzellen noch nicht beschrieben. Der Hinweis auf TIZ-TEX als Initiator zielzell-inhärenter Programme könnte das Spektrums adjuvanter Therapien beim PaKa erheblich erweitern.