

Annie Li
Dr. med.

Collagen XVII promotes proliferation and migration of pancreatic ductal adenocarcinoma through regulation of PIK3R5 and is associated with poor oncological outcome

Fach/Einrichtung: Chirurgie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Oliver Strobel

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist eine aggressive Krebserkrankung mit der niedrigsten Überlebensrate aller Krebsarten in den USA. Es wird voraussichtlich bis 2030 die zweithäufigste Ursache krebsbedingter Todesfälle werden. Die schlechte Prognose der Patienten ist darauf zurückzuführen, dass die Diagnose in den meisten Fällen erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium gestellt wird, da die Krankheit lange asymptomatisch verläuft. Daher sind die Behandlungsmöglichkeiten begrenzt und nur 20% der Patienten kommen zum Zeitpunkt der Diagnose für eine chirurgische Resektion in Frage. Darüber hinaus führt die komplexe Tumormikroumgebung zu einer hohen Chemotherapeutika-Resistenz und einem schlechten Ansprechen auf systemische Therapien. Die Mikroumgebung des PDACs ist durch eine desmoplastische Reaktion gekennzeichnet, die Produktion von einer großen Menge an Extrazellulärmatrix, wodurch ein fibrotisches Stroma entsteht. Das Stroma schafft eine hypoxische und hypovaskularisierte Umgebung, und formt eine Barriere um den Tumor, was zur hohen Chemoresistenz von PDAC beiträgt. Die zellulären Komponenten des Stromas sind hauptsächlich Immunzellen und krebsassoziierte Fibroblasten (CAFs). CAFs entwickeln sich aus Pankreassternzellen, deren morphologische Veränderung durch Entzündungen und PDAC-Signalwege ausgelöst wird. Die Wechselwirkungen zwischen CAFs und Krebszellen führen zu aggressiverem Tumorwachstum und Metastasierung. Der Großteil der Tumormasse von PDAC besteht aus Kollagenen, hauptsächlich Kollagen I, III und V. Die hauptsächliche Rolle von Kollagenen ist die strukturelle Integrität von Gewebe zu gewährleisten, jedoch haben sie auch Funktionen als Signalproteine. Kollagen XVII ist ein transmembranöses Protein, und zusammen mit Integrin $\alpha 6\beta 4$, BP230, Plectin, und CD151 bildet es das Hemidesmosom Typ I. Das Hemidesmosom Typ I ist im geschichteten und pseudo-geschichteten Epithel vorhanden und dient der Adhäsion der Epithelzellen an der darunterliegenden Basalmembran. Neben der Rolle als strukturelle Komponente des Hemidesmosoms, spielt Kollagen XVII nachweislich ebenfalls eine Rolle in der Zellmigration von Keratinozyten und in der Zeldifferenzierung von haarfollikelassoziierten pluripotenten Stammzellen.

Diese Dissertation untersucht die Rolle von Kollagen XVII in PDAC. Kollagen XVII ist im Gegensatz zu den anderen Hemidesmosom Typ I-Komponenten Integrin $\alpha 6$, Integrin $\beta 4$ und dem extrazellulären Bindungspartner Laminin 332 nicht in normalem Pankreasgewebe exprimiert. Diese drei Proteine sind ebenfalls Teil des Hemidesmosom Typ II, welches in

einfachem Epithel des Pankreas vorzufinden ist, weshalb die Präsenz dieser Proteine im normalen Pankreas erwartet wird. Immunhistochemische Untersuchungen eines Gewebe-Mikroarrays von 46 therapienaiven PDAC-Patienten zeigten, dass eine hohe Expression von Kollagen XVII mit einem schlechteren medianen Gesamtüberleben korreliert. Diese Ergebnisse wurden durch die Analyse von RNA-Sequenzierungsdaten von 176 PDAC-Patienten aus dem Human Protein Atlas bestätigt. In diesen korrelierte hohe COL17A1-Expression ebenfalls mit einem schlechteren Gesamtüberleben. Die Expressionslevel der Proteine Integrin α 6, Integrin β 4 und Laminin 332 zeigten keine Korrelation mit dem Gesamtüberleben von PDAC-Patienten. Diese Daten deuten auf eine unabhängige Rolle von Kollagen XVII in PDAC hin, abseits der normalen Funktion im Hemidesmosom Typ I.

Im folgenden Teil des Projekts wurde die Rolle von Kollagen XVII in PDAC-Zellen mit Hilfe von *in vitro* Modelle untersucht. Western Blot Analysen von sechs Patienteneigenen PDAC-Zelllinien bestätigten die heterogene Expression von Kollagen XVII in PDAC. Es wurde keine Expression in humanen duktalem Pankreasepithel und CAFs gefunden. Co-Kultur-Experimente von drei PDAC-Zelllinien mit CAFs zeigten eine Hochregulierung von COL17A1-Expression auf RNA- und Protein-Ebene in den Krebszellen nach Co-Kultur im Gegensatz zur Mono-Kultur, während in den CAFs weder in Mono- noch Co-Kultur eine Expression von Kollagen XVII nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle von Kollagen XVII in den Wechselwirkungen zwischen Krebszellen und Stroma hin. Ein permanenter Knockdown von Kollagen XVII wurde durch eine lentivirale Transduktion von drei COL17A1-spezifischen short hairpin RNAs erreicht. Nach dem Knockdown von Kollagen XVII zeigten PDAC-Zellen eine reduzierte Zellviabilität und reduziertes Migrationsverhalten. Diese Eigenschaften korrelieren mit dem Wachstum und dem Metastasierungspotential von Krebszellen und deuten somit auf einen möglichen Mechanismus hinter dem kürzeren Gesamtüberleben bei Patienten mit hoher Kollagen XVII-Expression hin.

Um das komplexe Tumormikromilieu des PDACs besser nachzuahmen, wurde ein orthotopes Mausmodell eingesetzt, um die Auswirkung von Kollagen XVII-Knockdown zu untersuchen. PDAC-Zellen, die entweder einen Kontrollvektor oder einen von zwei COL17A1-spezifische Vektoren exprimierten, wurden in das Pankreas von immundefizienten Mäusen implantiert und nach 5,5 Wochen entnommen. Die Größe und das Gewicht in den Knockdown-Tumoren waren um 50% geringer im Gegensatz zu den Kontrolltumoren und der Proliferationsindex der Knockdown-Tumore verringerte sich um mehr als 40%. RNA-Sequenzierung der orthotopen Tumoren offenbarte eine 32-fache Herabregulation des PIK3R5-Gens. PIK3R5 kodiert eine regulatorische Untereinheit, die mit PI3K Typ IB interagiert, welches den PI3K/AKT-Signalweg reguliert. Der PI3K/AKT-Signalweg ist bekannt für seine Rolle in Krebserkrankungen, und fördert Proliferation, Zellüberleben und Metastasierung von Krebszellen. Der Signalweg kann durch spezifische Inhibitoren gezielt beeinflusst werden. Daher könnte Kollagen XVII ein potenzielles Ziel für Therapien und als Biomarker für die Prognose und den Aktivierungsstatus des PI3K-Signalwegs in Frage kommen.