

Funkčná a molekulárna charakterizácia mezenchýmových stromálnych buniek izolovaných z tukového tkaniva zdravých donorov a pacientov s karcinómom prsníka

Mgr. Jana Plavá^{1,2}
(onkológia)

Spoluautori: Mgr. Marína Cihová, PhD.¹, Ing. Monika Buríková, PhD.¹, MUDr. Martin Boháč, PhD.^{3,4}, Mgr. Lucia Kučerová, DrSc.¹, Mgr. Svetlana Miklíková, PhD.¹
Školiteľ: RNDr. Miroslava Matúšková, PhD.¹

¹Laboratórium molekulárnej onkológie, Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV;
²Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave; ³II. Onkologická Klinika LF UK a NOÚ, Bratislava; ⁴Klinika chirurgickej onkológie NOÚ, Bratislava

Úvod

Počas progresie nádorového ochorenia dochádza k interakcii nádorových buniek s bunkami, ktoré sa nachádzajú v ich bezprostrednej blízkosti – s tzv. bunkami nádorového mikroprostredia. Takéto medzibunkové interakcie vplývajú na proliferáciu, agresivitu a metastázovanie nádorových buniek (1, 2). V prípade nádorov prsníka ide hlavne o interakciu s bunkami nachádzajúcimi sa v tukovom tkanive. Tá je zatiaľ len slabo preštudovaná a zmeny, ktoré nádorové bunky spôsobujú v bunkách nádorového mikroprostredia môžu pretrvávajúť v okolitom tkanive aj po odstránení nádorového tkaniva a môžu tak prispieť k relapsu ochorenia. V našej práci sme sa zamerali na vlastnosti mezenchýmových stromálnych buniek (z ang. *mesenchymal stromal cells* - MSC) izolovaných zo zdravého tukového tkaniva a z okolia prsníkových nádorov. Pochopenie funkčných vlastností a rozdielov medzi zdravými a s nádorom asociovanými bunkami môže predstavovať významný krok pri vývoji nových liečebných postupov či prevencii zameranej na nádorové mikroprostredie.

Materiál a metódy

Chemikálie: Použité chemikálie boli zakúpené v Sigma-Aldrich, ak nie je uvedené inak.

Kultivácia buniek: MSC sme izolovali z prsníkového tukového tkaniva, ktoré sme získali v spolupráci s pracoviskami Univerzitnej nemocnice v Ružinove a Národným onkologickým ústavom po schválení etickou komisiou a s informovaným súhlasom darcýň. Bunky sme izolovali použitím kolagenázy I (40 mg/ml) a následne kultivovali v nízkoglukózovom (1 g/l) médiu DMEM (PAA Laboratories GmbH, Austria) s L-glutamínom (2 mM), 10 % fetálnym hovädzím sérom (Biochrom AG, Germany) a antibiotikami (10 000 IU/ml penicilín; 5 µg/ml streptomycín; 2,5 µg/ml amfotericín B).

Komerčne dostupnú prsníkovú nádorovú bunkovú líniu JIMT-1 (DSMZ, Germany, DSMZ no.: ACC 589) fluorescenčne značenú pomocou NucLight™Red (Essen BioScience, USA), ďalej v texte ako NLR-JIMT, sme kultivovali vo vysokoglukózovom médiu (4,5 g/l) DMEM s rovnakými aditívami ako pri nádorových líniách.

Morfológia, migrácia a proliferácia MSC: Experimenty sme uskutočnili v 96-jamkovej platničke v hexaplikátoch (morfológia a proliferácia: 5×10^3 buniek na jamku, migrácia: $2,3 \times 10^4$ buniek na jamku). Morfológiu a migráciu sme následne sledovali a vyhodnotili pomocou kinetického zobrazovacieho systému IncuCyte ZOOM™. V prípade proliferácie sme sledovali množstvo ATP v bunkách pomocou RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (Promega Corporation, USA) a prístroja LUMIstar GALAXY reader (BMG Labtechnologies, Germany).

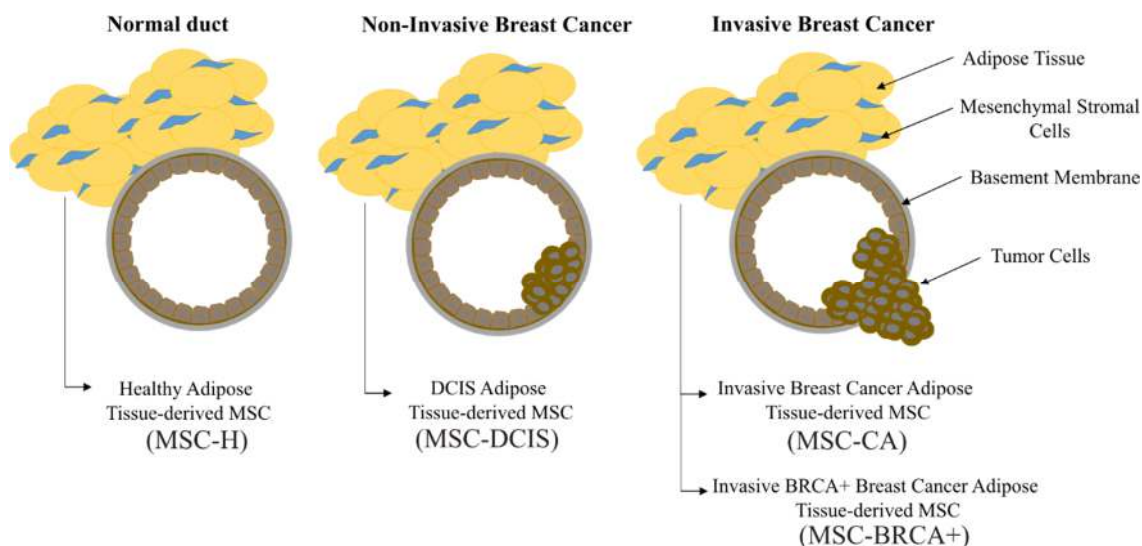
Expresný profil MSC: Na izoláciu RNA sme použili AllPrep RNA/Protein kit (Qiagen) a na cDNA prepis RT2 First Strand Kit (Qiagen). Expresiu 84 špecifických ľudských MSC génov v jednotlivých skupinách patientskych MSC izolátov sme porovnali s expresiou v MSC-H pomocou Human Mesenchymal Stem Cells RT2 Profiler™ PCR Array (PAHS-082ZD; Qiagen, Germany) a prístroja Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad, UK).

Sekrečný profil MSC: Sekretované cytokíny a chemokíny sme analyzovali v bezsérovom kondicionom MSC médiu pomocou Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems™, USA) a vyhodnotili v ImageJ software (NIH, USA). Koncentráciu vybraných cytokínov sme stanovili pomocou ELISA kitu (R&D Systems).

Tumorigenicita MSC *in vivo*: Šesťtýždňovým SCID/Beige myšiam (SCID/bg, Charles River, Germany) sme subkutánne bilaterálne injikovali zmes MSC (5×10^5 buniek) a NLR-JIMT (1×10^6 buniek) v 100 μ l bezsérového DMEM zriedného 1:1 s ECM gélom. Myši sme rozdelili do piatich skupín: kontrolná skupina - samotné NLR-JIMT (n = 6), MSC-H (n = 6), MSC-DCIS (n = 6), MSC-CA (n = 6) a MSC-BRCA (n = 5). Nádory sme pravidelne merali a objem nádoru sme vypočítali podľa vzorca: $\text{objem} = (\text{dĺžka} \times \text{šírka}^2) / 2$. V súlade s etickými usmerneniami boli zvieratá usmrtené keď nádor presiahol veľkosť 1 cm^3 .

Výsledky

U MSC vyzolovaných zo vzoriek tukového tkaniva sme overili schopnosť adherovať na plast, pozitivitu na povrchové markery CD90, CD105, CD73, negativitu na markery CD14, CD20, CD34, CD45 a schopnosť diferencovať *in vitro* do adipocytov, osteocytov a chondrocytov. Získali sme viac ako 300 izolátov spĺňajúcich kritériá definujúce MSC, rozdelených do skupín podľa pôvodu (Obr. 1).



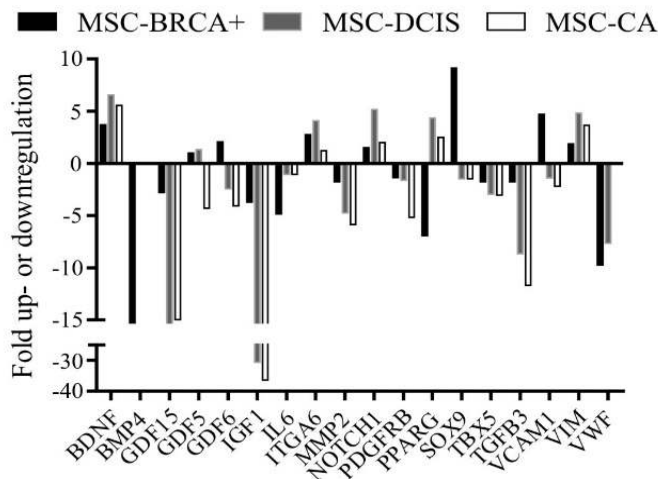
Obr. 1: MSC sme izolovali zo 4 typov tukového tkaniva: tkanivo od zdravých žien po mamoplastike (kontrola – „zdravé MSC“; MSC-H) a od troch skupín pacientok s karcinómom prsníka: MSC z tukového tkaniva z okolia premalígnej lézie (MSC-DCIS), malígnej lézie (MSC-CA) a od BRCA pozitívnych pacientok (MSC-BRCA). (3)

Morfológia všetkých izolátov MSC je podobná fibroblastom - podlhovastá až vretenovitá, pričom sme nepozorovali rozdiely súvisiace s diagnózou či vekom darcýň. Migračné vlastnosti MSC sme stanovili pomocou *wound healing assay*. Monovrstvu MSC sme narušili

a nechali bunky 24 hodín migrovať do tohto priestoru. Pozorovali sme vysokú migračnú schopnosť MSC (v priemere 65,5 %), pričom migračné vlastnosti MSC nekorelujú s diagnózou ani s vekom darkýň.

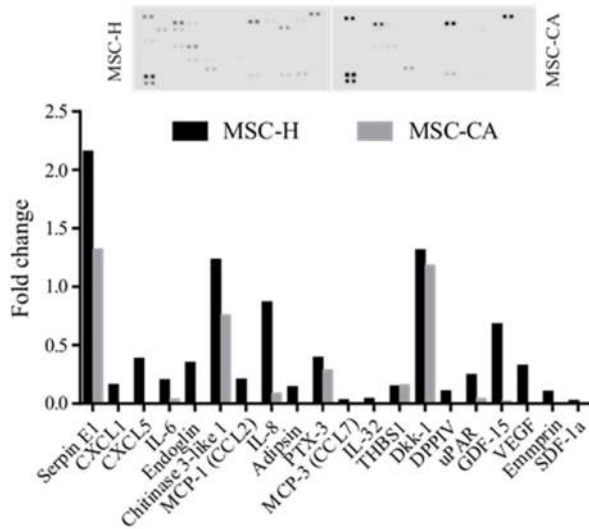
Pri sledovaní proliferácie sme pozorovali signifikantný rozdiel iba pri porovnaní proliferáčnych vlastností MSC-H a MSC-CA – pozorovali sme signifikantne vyšší čas zdvojenia buniek u skupiny MSC-CA ($p < 0.05$, Mann Whitney test). Pri rozdelení izolátov podľa BMI a veku darkýň sme nepozorovali žiaden signifikantný rozdiel.

Na porovnanie expresného profilu medzi jednotlivými skupinami MSC sme použili RT2 Profiler™ PCR Array. Expresie viacerých génov u MSC asociovanými s nádorom boli oproti expresnému profilu MSC-H zmenené (Obr. 2). V skupinách MSC-DCIS a MSC-CA sme zistili zvýšenú expresia génov BDNF, NOTCH1 a VIM a naopak znižujú expresiu GDF15, IGF1, MMP2, PDGFRB a TGFB3. V skupine MSC-BRCA sme pozorovali niekoľko rozdielov voči ostatným skupinám - znižujú expresiu génu BMP4 a zvyšujú pri SOX9 a VCAM1.

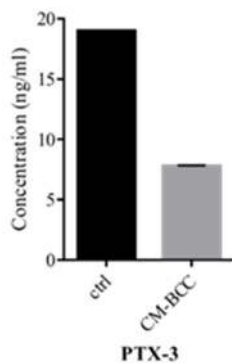


Obr. 2: Porovnanie expresného profilu zdravých MSC a s nádorom asociovaných MSC. Najvýraznejšie zmeny génovej expresie sme zaznamenali pri génoch BDNF, GDF15 a IGF1 (3).

Pri porovnaní sekrečného profilu zdravých a s nádorom asociovaných MSC pomocou cytokínového kitu sme pozorovali zníženie sekrécie cytokínov pri skupine MSC-CA. V tejto skupine sme detegovali iba 9 zo 105 testovaných cytokínov (Obr. 3). Aby sme dokázali, že znížená sekrécia cytokínov pri MSC-CA je spôsobená sekréciou molekúl nádorovými bunkami v okolitom tukovom tkanive, kultivovali sme zdravé MSC v kondicionovanom médiu z nádorových buniek (CM-BCC) a analyzovali sme koncentráciu vybraného cytokínu – PTX3. Jeho koncentrácia po ovplyvnení zdravých buniek takýmto médiom výrazne klesla v porovnaní s MSC-H, ktoré boli držané v čistom médiu (Obr.4) (3).

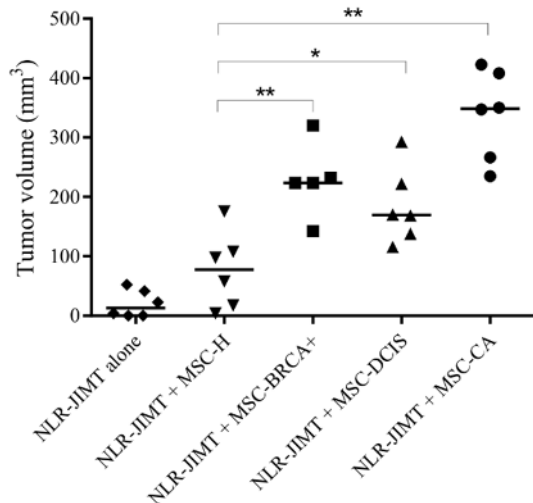


Obr. 3: Zmeny sekrečného profilu MSC z okolia invazívneho nádoru prsníka. Pomocou cytokínovej array sme detegovali znížené zmožstvo cytokínov a chemokínov pri MSC, ktoré boli izolované z tukového tkaniva z okolia nádoru v porovnaní so zdravým tukovým tkanivom. (3)



Obr. 4: Koncentrácia PTX3 cytokínu sa znížila po ovplyvnení zdravých MSC kondiciovaným médiom z nádorových buniek (CM-BCC). (3)

Na porovnanie efektu jednotlivých skupín MSC na rast nádorov *in vivo* sme imunodeficientným SCID/bg myšiam subkutánne podali NLR-JIMT1 bunky samé alebo v kombinácii s MSC. Analýza objemu nádorov ukázala, že nádory tvorené samotnými nádorovými bunkami mali najmenší objem. Zaznamenali sme signifikantne väčší objem nádorov tvorených z NLR-JIMT1 podaných spolu s MSC izolovaných z tuku z okolia nádoru oproti tumorom, kde sme spolu s nádorovými bunkami myšiam podali MSC izolované zo zdravého tuku ($p < 0.01$ pri MSC-H vs. MSC-CA a MSC-H vs. MSC-BRCA; $p < 0.05$ pri MSC-H vs. MSC-DCIS). Najväčší tumorigénny efekt sme pozorovali pri podaní MSC izolovaných z tuku pacientky s invazívnym karcinómom prsníka (MSC-CA). Priemerný objem nádorov bol pri NLR-JIMT xenograftoch $20,1 \text{ mm}^3$. Pri podaní NLR-JIMT spolu s MSC-CA sme na 15ty deň namerali priemerný objem nádorov $338,3 \text{ mm}^3$, čo je skoro 4,5-násobne viac ako pri xenograftoch tvorených z NLR-JIMT a MSC-H (76.6 mm^3) (Obr. 5).



Obr. 5: MSC izolované z tukového tkaniva z okolia nádoru podporujú rast nádorových buniek *in vivo*. Objem nádorov meraný na 15. deň experimentu. Zaznamenali sme podporný efekt MSC na rast nádorových buniek. Najviac signifikantný efekt na rast nádorových buniek sme pozorovali pri skupine myší, ktorým sme injekovali nádorové bunky spolu s MSC-CA (*p-value < 0.05, **p-value < 0.01, Man-Whitney test).(3)

Diskusia

Vzájomná interakcia nádoru s okolitým mikroprostredím je významným faktorom pre jeho rast, progresiu a metastázovanie. Významná úlohu tu zohrávajú mezenchýmové stromálne bunky (1,2,4). Zatiaľ však máme pomerne málo informácií o MSC izolovaných z prsníkového tukového tkaniva z okolia nádorov. Táto práca je zameraná na vlastnosti takýchto MSC a na odhalenie fenotypových, funkčných a molekulárnych zmien spôsobených prítomnosťou nádoru v okolí tukového tkaniva.

V prvom rade sme sa zamerali na morfológické odlišnosti, ktoré boli zatiaľ opísané len pri diferenciácii do nádorovo-asociovaných fibroblastov (5). Ani v našej štúdiu sa nepotvrdil výskyt zmien súvisiacich s vekom alebo diagnózou pacientky. Predpokladáme, že nádor nemá vplyv na morfológiu MSC izolovaných z tuku v blízkosti nádoru. Nedá sa však vylúčiť, že k strate prípadného zmeneného morfortypu mohlo dôjsť v dôsledku *in vitro* kultivácie. Zaoberali sme sa aj štúdiom proliferácie a času zdvojenia, keďže v literatúre je popísaný vplyv veku na čas zdvojenia MSC bez zmeny v proliferácii (6). V našom súbore vzoriek sme nezaznamenali zmenu proliferácie ani v súvislosti s vekom ani s BMI pacientky. Dokázali sme však rozdiely v čase zdvojenia buniek, konkrétne porovnaním MSC-CA oproti MSC-H. Porovnanie tejto doby u mladších a starších daryň po následnom rozdelení na zdravých a chorých darcov ukázalo zvýšený čas zdvojenia MSC u starších daryň.

Významné zmeny medzi skupinami sme zaznamenali v génovej expresii, predovšetkým u expresie génov GDF5, GDF6, IGF1, PDGFRB a TGFB3 pri porovnaní skupín MSC-CA a MSC-H. Aktivita génov GDF5 a TGFB3 je asociovaná s metastázovaním a relapsom primárnych nádorov (7). S metastázovaním je spojený aj NOTCH1, ktorého pozitívita je spojená so skráteným prežívaním bez relapsu u pozitívnych pacientov (8). Naopak gén BMP4 je u karcinómov prsníka silným supresorom metastázovania (9). Jeho znížená expresia u MSC-BRCA preto môže súvisieť so zvýšeným metastázovaním nádorových buniek. Blízky kontakt MSC-CA s nádorom pravdepodobne zodpovedá za zníženú sekréciu cytokínov u týchto buniek. V súlade s týmto predpokladom sme ukázali, že u zdravých MSC kultivovaných v kondicionovanom médiu z nádorových buniek (médiu, do ktorého nádorové bunky vylučujú rôzne molekuly) dochádza k zníženiu sekrécie cytokínov. Na základe našich

predchádzajúcich experimentov (3) vieme, že MSC komunikujú s nádorovými bunkami aj priamym kontaktom. Obidva typy komunikácie, nepriama (cytokínová) aj priama (*nanotubes*), môžu prispievať k zvýšenej invazivite a vysokej agresivite fenotypu MSC-CA. Na základe *in vivo* experimentov môžeme tvrdiť, že diagnóza pacienta vplýva na tumorigenicitu nádorových buniek koinjekovaných s MSC izolovanými z príslušného tukového tkaniva. Výsledok poukazuje na trend zvýšenia tumorigenicity v prítomnosti MSC izolovaných od pacientok s vyšším štádiom ochorenia.

Táto práca vznikla s podporou projektov Agentúry na podporu vývoja a výskumu APVV-16-0010, APVV-16-0178 a projektmi VEGA 1/0271/17. Experimenty na prístroji IncuCyte ZOOM™ boli uskutočnené s finančnou podporou Nadácie Výskum rakoviny a Ligy proti rakovine.

Zoznam použitej literatúry

1. Melzer C, Yang Y, Hass R: Interaction of MSC with tumor cells. *Cell Commun Signal.* 2016; 14(1): 20.
2. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Molecular cancer.* 2017; 16(1):31. Epub 2017/02/06
3. Plava J, Cihova M, Burikova M, a kol. Permanent pro-tumorigenic shift in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells induced by breast malignancy. *Cells.* 2020 Feb 19;9(2).
4. Jotzu C, Alt E, Welte G, Li J, Hennessy BT, Devarajan E, a kol. Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. *Cell Oncol (Dordr).* 2011; 34(1):55-67. Epub 2011/02/18.
5. Visweswaran M, Keane KN, Arfuso F, Dilley RJ, Newsholme P, Dharmarajan A. The Influence of Breast Tumour-Derived Factors and Wnt Antagonism on the Transformation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells into Tumour-Associated Fibroblasts. *Cancer microenviron.* 2018; 11(1):71-84. Epub 2018/04/11.
6. Maredziak M, Marycz K, Tomaszewski KA, Kornicka K, Henry BM. The Influence of Aging on the Regenerative Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells international.* 2016; 2016:2152435. Epub 2016/03/05.
7. Morales M, Planet E, Arnal-Estape A, Pavlovic M, Tarragona M, Gomis RR. Tumor-stroma interactions a trademark for metastasis. *Breast.* 2011;20 Suppl 3:S50-5. Epub 2011/11/02.
8. Zhong Y, Shen S, Zhou Y, Mao F, Lin Y, Guan J, a kol. NOTCH1 is a poor prognostic factor for breast cancer and is associated with breast cancer stem cells. *Oncotargets and therapy.* 2016;9:6865-71. Epub 2016/11/18.
9. Cao Y, Slaney CY, Bidwell BN, Parker BS, Johnstone CN, Rautela J, et al. BMP4 inhibits breast cancer metastasis by blocking myeloid-derived suppressor cell activity. *Cancer research.* 2014;74(18):5091-102. Epub 2014/09/17.