

Reaktivt stroma i pankreassjukdomar

Titel: The reactive stroma in pancreatic diseases.

Länk: https://openarchive.ki.se/xmlui/bitstream/handle/10616/46707/Thesis_Jessica_Norberg.pdf?sequence=11&isAllowed=y

Huvudhandledare: Matthias Löhr, Professor, Karolinska Institutet, Department of Clinical Intervention and Technology, Division of Surgery.

Biträdande handledare: Rainer Heuchel, Senior researcher, Karolinska Institutet, Department of Clinical Intervention and Technology, Division of Surgery. Arne Östman, Professor, Karolinska Institutet, Department of Oncology and Pathology.

Opponent: Malin Sund, Professor, Umeå University, Department of Surgical and Perioperative Sciences, Division of Surgery.

Stroma, eller aktiverad bindväv, är en nyckelkomponent i både pankreatit och pankreatiska tumörer. Det övergripande målet med denna avhandling, var att öka förståelsen om den roll som det reaktiva stromat spelar i pankreatiska sjukdomar.

Biomarkör för akut pankreatit

Akut pankreatit kan vara alltifrån ett milt, lokalt tillstånd till en systemisk sjukdom med allvarliga komplikationer och hög dödlighet. Specifika markörer saknas fortfarande, framförallt en tidig markör som tillförlitligt kan förutse sjukdomens svårighetsgrad. Det inflammatoriska svaret i akut pankreatit medieras delvis via oxidativ stress och calcineurin-NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)-signalering. CN-NFAT inducerar sin egen negativa regulator, regulator of calcineurin 1 (RCAN1). Caerulein-induktion, som är en väletablerad djurförsöksmodell av experimentell akut pankreatit, ökar CN-NFAT-signalering, reaktiva syreradikaler och inflammation.

I delarbete I sökte vi efter nya potentiella biomarkörer för akut pankreatit. För att screena efter nya markörer, inducerade vi akut pankreatit hos möss med hjälp av caerulein (n=6). Gennuttrycket i pankreasvävnad jämfördes sedan mellan caerulein-behandlade möss och kontroller som injicerats med natriumklorid (n=5), och vi fann 2038 gener med skilt uttryck. Vi bekräftade uttrycket av de mest intressanta generna med realtids-PCR och gick därifrån vidare med de två mest lovande kandidaterna, *Rcan1* och *Sesn2* (sestrin 2). Dessa gener valdes ut baserat på robust reglering, tillgängliga verktyg för detektion samt nyhetsvärde inom akut pankreatit. Båda kandidaterna visade sig vara reglerade av oxidativ stress; gennuttrycket uppreglerades efter stimulering med både caerulein och väteperoxid och denna uppreglering hämmades av antioxidanten N-acetylcystein. Eftersom regleringen av *Rcan1* var mer konsekvent undersökte vi även proteinnivåer med ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), och *Rcan1* protein fanns vara uppreglerad i blodplasma hos möss tidigt efter caerulein-induktion, samt i patienter med akut pankreatit. Detta tyder på en potentiell användning för *Rcan1* som markör för akut pankreatit, till exempel för post-ERCP-pankreatit.

Prognostisk markör för pankreatiskt duktalt adenokarcinom

Pankreatiskt duktalt adenokarcinom (PDAC) är den vanligaste formen av pankreascancer och har en dystert prognos, delvis på grund av resistens mot tillgängliga behandlingar. Det så kallade reaktiva eller desmoplastiska stromat har blivit ett av kännetecknen för sjukdomen. Interaktioner mellan cancerceller och omgivande stromaceller har visat sig spela en viktig roll i utvecklingen och tillväxten av cancer, och får alltmer fokus från forskare världen över.

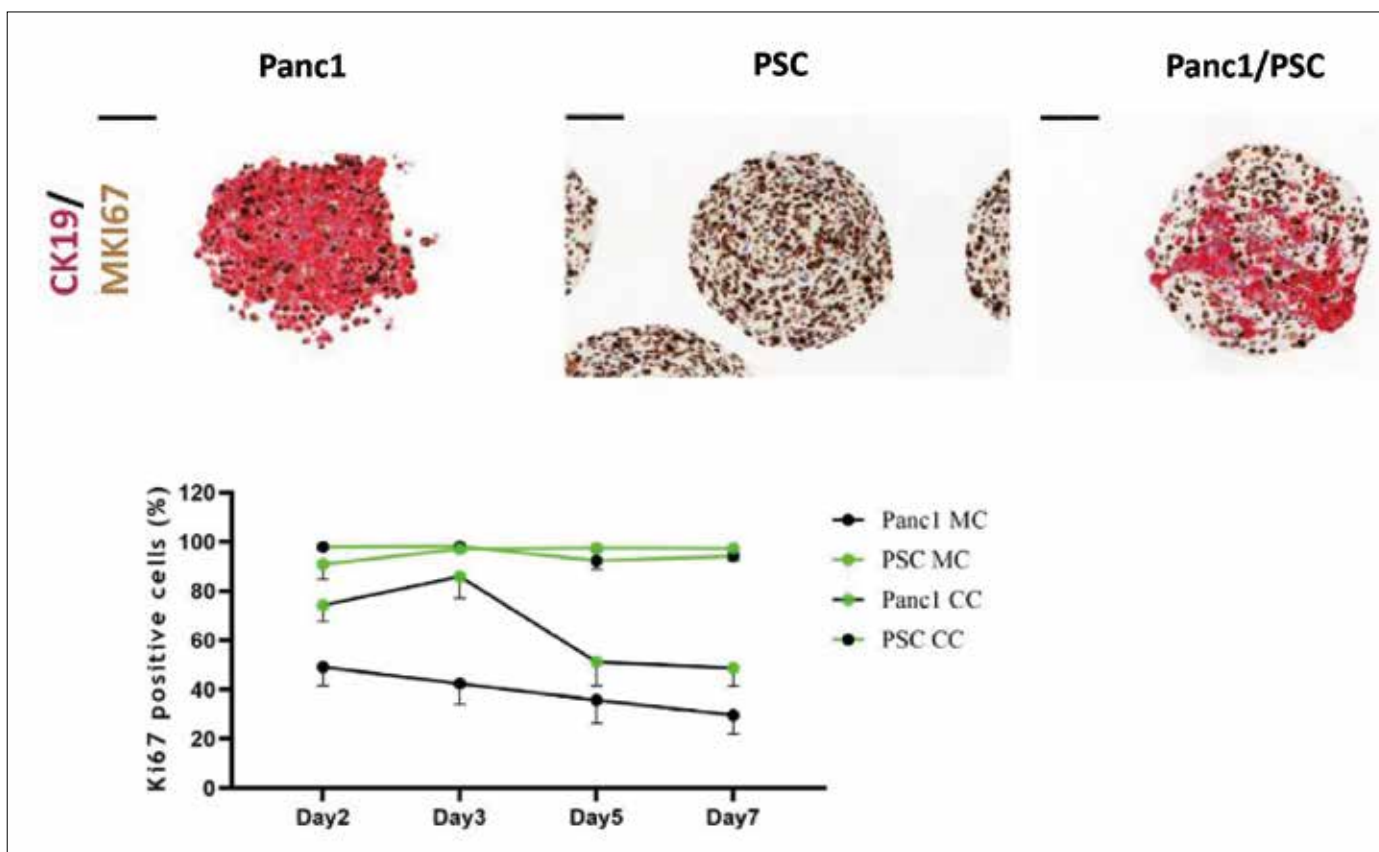
Produktionen av tumörassocierat stroma drivs av tillväxtfaktorer såsom platelet derived growth factor (PDGF) och transforming growth factor beta (TGFB1), som produceras av cancerceller och aktiverar fibroblaster och andra mesenkymala celler, till exempel pankreatiska stellatceller (PSCs), som i sin tur producerar mer extracellulärt matrix.

Ett överuttryck av proteinet High mobility group A2 (HMGA2) har associerats med många olika cancerformer samt med EMT (epithelial-mesenchymal transition) och cancerstamceller.

I delarbete II kunde vi visa att HMGA2 korrelerade med lägre överlevnad i en kohort av 253 PDAC-patienter, och var en oberoende prognostisk markör. Tumörceller positiva för HMGA2 var också signifikant korrelerade med ett stroma positivt för Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta (PDGFRB). Kombinerade injektioner med en etablerad cellinje för PDAC (Panc1) och pankreatiska stellatceller (PSCs) *in vivo* ökade tumörtillväxten och även uttrycket av HMGA2 och PDGFRB. *In vitro* ökade uttrycket av HMGA2 i Panc1-celler som fått växa i 3D-sfäroider, både från co-kultur med PSCs och via stimulering med Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFB1).

En ny *in vitro* modell i 3D av pankreascancer

Funktionen av stromat i PDAC är oklart. Forskning har visat att det främjar tumörtillväxten och att gemcitabine, standardbehandlingen vid PDAC, har problem att penetrera stromat. Kliniska prövningar där stromat slogs ut visade dock förvånande på en minskad överlevnad hos patienterna, vilket senare har backats upp av prekliniska studier där möss med minskat stroma hade mer aggressiva tumörer. Fokus har därför skiftat mot att istället försöka omskola



Figur: Immunohistokemisk infärgning av 3D-sfäroider med PDAC-celler (Panc1) och pankreatiska stellatceller (PSCs). Epitelcellsmarkören cytokeratin 19 (CK19, röd) färgar Panc1-cellerna och proliferationsmarkören MKI67 (brun) färgar prolifererande celler av båda celltyper. Grafen visar procent Ki67-positiva celler av respektive celltyp i mono- och co-kulturer. MC = mono-kultur, sfäroid med endast en celltyp, CC = co-kultur, sfäroid med både Panc1 och PSC.

stromat. Det är tydligt är att vi inte vet tillräckligt mycket om det uppenbarligen komplexa stromat i PDAC, och vi behöver bättre modeller för att kunna studera interaktionerna mellan cancerceller och stromaceller.

Traditionell cellodling i mono-lager skiljer sig från verkligheten och det blir allt vanligare med cellodling i 3D. Det är nu allmänt accepterat att cellinteraktioner i 3D påverkar cellsignalering som initieras av lösliga faktorer, vilket har stor påverkan på cellfunktion.

I delarbete III, utvecklade och karakteriserade vi den 3D co-kulturmodell med PDAC-celler och pankreatiska stellatceller, som också användes i delarbete II. För att göra detta använde vi oss av immunhistokemi och realtids-PCR. Tumörcellerna inom co-kulturerna identifierades genom immunhistokemisk infärgning med cytokeratin-19. Vi utvecklade också en ny metod för att detektera celltypspecifikt mRNA-uttryck inom co-kulturerna utan att behöva fysiskt separera cellerna. För denna virtuella sortering odlades humana PDAC-celler med stellatceller från mus och tvärtom. Genuuttrycket analyserades därefter med realtids-PCR med egendesignade artspecifika primers. Studien visade att co-kultur med PDAC-celler och pankreatiska stellatceller ledde till aktivering av stellatcellerna och en ökad proliferation av tumörcellerna.

Sammanfattningsvis har arbetet bakom denna avhandling identifierat RCAN1 som en ny markör för akut pankreatit och HMGA2 som en prognostisk markör för pankreatiskt duktalt adenokarci-

nom. Dessutom utvecklades en ny 3D *in vitro* co-kulturmodell av PDAC, och en metod för att identifiera celltypspecifikt genuuttryck i 3D co-kulturer, utan att behöva fysiskt separera cellerna.

Jessica Norberg

Apotekare och Medical writer

Delarbeten:

- I. **Norberg KJ**, Nania S, Li X, Gao H, Szatmary P, Segersvärd R et al. Rcan1 is a marker of oxidative stress, induced in acute pancreatitis. *Pancreatology* 2018; 18: 734-741.
- II. Strell C, **Norberg KJ**, Mezheyeuski A, Schnittert J, Kuninty PR, Moro CF et al. Stroma-regulated hmg2 is an independent prognostic marker in pdac and aac. *Br J Cancer* 2017; 117: 65-77.
- III. **Norberg KJ**, Liu, X, Fernandez Moro C, Strell C, Nania S, Blümel M et al. A novel pancreatic tumor and stellate cell 3D co-culture spheroid model. *BMC Cancer* 2020; 475.

Jessica Norberg

Ålder: 35 år

Familj: Sambo och en dotter på snart 1 år

Bor: Strängnäs

Sysselsättning: Apotekare och Medical writer (egenföretagare)