

Thematische Relevanz

Das Pankreas-Adenokarzinom ist die zehnthäufigste Krebserkrankung und die vierthäufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen und weist, neben dem Mesotheliom, die niedrigsten Überlebensraten unter allen Krebserkrankungen auf. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Menschen mit Bauchspeicheldrüsenkrebs liegt im Durchschnitt bei etwa 9% und hängt davon ab, ob der Krebs in einem frühen (32%) oder späten Stadium (3%) erkannt wird. Diese Zahlen geben einen Hinweis auf die Relevanz der Erkrankung und auf die nach wie vor schlechte Behandlungsmöglichkeit.

Trotz der steigenden staatlichen und privaten Investitionen in die Forschung und Entwicklung sind hinsichtlich der Therapie und Heilung dieser Tumorerkrankung nur sehr geringe Erfolge erzielt worden. Ein wesentlicher Grund ist, dass es bereits in der präklinischen Entwicklung kaum aussagekräftige Testsysteme gibt, die es erlauben aus einer Substanz-Bibliothek potenzielle Wirkstoffe zu finden, die in der späteren Phase zu einem Arzneimittel entwickelt werden können. So widerspiegeln die zurzeit verwendeten humanen *in vitro* Tumorzell-Monokulturen nur sehr wenige Aspekte der Tumorgenese und Tumormodelle in Tieren haben wegen der physiologischen Unterschiede zum Menschen kaum direkte human-medizinische Relevanz. Dazu sind Wirkstoffscreenings mit höherem Durchsatz nur mit phylogenetisch weit entfernten Spezies, wie z.B. Zebrafischen durchführbar. Diese Tatsachen zeigen eindeutig auf, dass klinisch relevante Modelle erforderlich sind, um Krankheits-spezifische molekulare Mechanismen aufzuklären und neue therapeutische Wirkstoffe entdecken zu können.

Daher wurden im Rahmen des Projekts „Competent Headquater (FFG)“, gemeinsam mit der Firma Molecular Device (Hersteller von Hochdurchsatzgeräten für das Drug Screening), prädiktive Tumormodelle aufgebaut, mit denen eine große Zahl von Wirkstoffen innerhalb eines 3-dimensionalen Tumor-ähnlichen Milieus getestet werden kann. Durch die stabile Integration eines optogenetisch manipulierten Schlüsselrezeptors können zusätzlich spezifische Signalkaskaden durch Licht ein- und auszuschaltet und durch den stabil integrierten Reporter die Signalwege in Echtzeit detektiert werden.

Einleitung

Um die Überlebensrate des Pankreas-Adenokarzinom (PAD) zu erhöhen, ist es unerlässlich, neuartige Zielmoleküle für Therapien zu finden, die spezifisch auf Tumorzellen bzw. Tumor-assoziierte Zellen abzielen. Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind wesentliche Bestandteile der angeborenen Immunantwort und daher einer der Schlüsselfaktoren bei der Erkennung und Abwehr eindringender Krankheitserreger. Einige Publikationen zeigen jedoch, dass TLRs auch an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, chronisch entzündlichen Erkrankungen und der Tumorentwicklung beteiligt sind. So konnte gefunden werden, dass TLRs auch auf unterschiedlichen Krebsarten wie Pankreaszellen exprimiert werden, während sie in der normalen Bauchspeicheldrüse nicht bzw. kaum detektierbar sind. TLRs scheinen daher eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von PAD zu spielen und stellen daher auch einen zentralen Angriffspunkt für Interventionen dar.

Die Optogenetik wurde von der Zeitschrift Nature Methods zur „Methode des Jahres 2010“ gekürt. Dabei handelt es sich um eine innovative Technik, die genetische und optische Methoden zur optischen Kontrolle von Zellen kombiniert und so das Target- und Assay-Portfolio mit einer Vielzahl neuer Ansätze bereichert. In der Optogenetik werden lichtempfindliche Proteindomänen von Photorezeptoren in Effektorproteine integriert, um sie mit Lichtreizen zu lenken. Folglich ermöglicht die Lichtinduktion die Aktivierung, Inaktivierung, Lokalisierung oder Stabilisierung/Destabilisierung von Signalwegen, je nach Proteintyp und Aufbau.

Methode

Konstruktion einer optogenetischen Zelllinie mit Licht-aktivierbaren TLR4.

Um eine Licht-induzierbare Zelllinie zu etablieren, wurde die cDNA der LOV-Domäne mit dem 3'Ende des TLR4 kloniert und mit Hilfe lentiviraler Transfektionsmethode stabil in die Pankreaskarzinomzelle integriert (Opto-TLR4-Panc-1-Zelllinie). Die Zellklone wurden auf TLR4-LOV-Expression und den zugrunde liegenden Signalweg nach Lichtstimulation (470nm) getestet. Die TLR4-Aktivierung der zugrunde liegenden Signalwege kann mit Hilfe des stabil integrierten NF-kappaB-Reportersystem in Echtzeit detektiert werden.

Ergebnisse

Die Panc-1-TLR4-LOV Zelllinie ist ein- und ausschaltbar.

Es konnte gezeigt werden, dass die Panc-1-TLR4-LOV Zelllinie bereits nach kurzer Lichtinduktion (1-7 min, 470nm) ein- und im Dunkeln wieder ausgeschaltet werden kann. Diese räumlich und zeitlich gesteuerte Aktivierung des TLR4/NF-κB Signalwegs kann mit Hilfe des stabilen Reportersystems (NF-κB-gLUC) in Echtzeit detektiert werden. Dazu ist die Aktivierungsstufe durch Licht höher als nach Stimulation mit Liganden (LPS). Um zu verifizieren, dass die neu geschaffene Zelllinie für die Etablierung klinisch-relevanter Testsysteme herangezogen werden kann, wurden die opto-TLR4-PANC-1-Zellen als 3D-Tumorsphäroide mit einem Anfangsdurchmesser von etwa 200µm kultiviert und mit Hilfe eines kombinierten High-Content-Analyseansatzes, der auf automatisierten Bildern mit Durchlichtmikroskopie und quantitativer Analyse basiert (Multiplexing), gescreent. Neben den spezifischen Signalweg (NF-κB Gaussia Luciferase) konnten noch verschiedene Parameter wie der Zellmetabolismus, Zelltod, die Größe der Tumorsphäroide, sowie das Potential zu metastasieren im Hochdurchsatz detektiert werden.

Conclusio

Die Aktivierung oder Inaktivierung von TLR4 unter Verwendung von Agonisten bzw. Antagonisten besitzt nur eine begrenzte räumliche und zeitliche Kontrolle über den zugrunde liegenden Signalweg. Die präzise und kontrollierte Aktivierung/Hemmung der TLR-Signalwege via Licht ermöglicht die Etablierung prädiktiver zellulärer Modelle, mit denen i) die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen von TLR4/NF-κB und Karzinogenese aufgeklärt, ii) neue Wirkstofftargets für die Entwicklung von Diagnoseprofilen und Wirkstoffdesign identifiziert und iii) neue Therapeutika entdeckt werden können.

Folgeprojekt

Das aufgebaute Know-how in der Entwicklung optogenetischer Zelllinie wird in einem Folgeprojekt „Inflammation, Sepsis, Regeneration: Entwicklung leistungsfähiger Diagnostikverfahren“ (FTI Programm, Land NÖ) in Kooperation mit der Donauuniversität und der KLPU weitergeführt. Dabei werden optogenetische TLRs in Endothelzellen und Monozyten kloniert, um neue Ansätze für die Behandlung von Sepsis zu finden. Projektlaufzeit 01.01.2020 – 31.12.2022

